



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biologia Cellulare (Biologia Cellulare e dello Sviluppo)

Dipartimento Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

Settore Scientifico Disciplinare Bio-06

Trasformazione di cellule staminali tiroidee in cellule staminali tumorali.

IL DOTTORE
DOTT. MARCO BONANNO

IL COORDINATORE
PROF.SSA GABRIELLA SCONZO

IL TUTOR
PROF.SSA GABRIELLA SCONZO

CICLO XXIV – (2011-2014)
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

Indice

	Pag.
Introduzione	3
I TUMORI DELLA TIROIDE	4
MUTAZIONI GENETICHE NEI CARCINOMI TIROIDEI	9
CELLULA STAMINALE: NORMALE VS TUMORALE	22
MODELLI DI CARCINOGENESI TIROIDEA	26
Scopo della tesi	30
Risultati	33
Discussione	43
Materiali e metodi	47
Bibliografia	58

INTRODUZIONE

I TUMORI DELLA TIROIDE

Classificazione dei carcinomi tiroidei

L'unità funzionale della tiroide è il follicolo, una struttura delimitata da epitelio cubico semplice che presenta una cavità centrale in cui si raccoglie la colloide. Il follicolo è costituito da due diversi tipi cellulari: le *cellule follicolari tiroidee* e le *cellule C o para-follicolari*. Le *cellule follicolari* sono responsabili della produzione degli ormoni tiroidei (T3 e T4) a partire dalla colloide e dallo Iodio; le *cellule C o para-follicolari* producono l'ormone calcitonina che insieme al paratormone (prodotto dalle paratiroidi) regola i livelli sierici del calcio.

I carcinomi tiroidei derivanti dalle *cellule follicolari* sono solitamente suddivisi in carcinomi ben differenziati e carcinomi scarsamente differenziati. I primi includono i *carcinomi papillare* (70% dei casi) e *follicolare* (20% dei casi) mentre il più raro e scarsamente differenziato è il *carcinoma anaplastico* (meno del 2% dei casi) (Figura 1). I carcinomi derivanti dalle *cellule C* costituiscono un'unica classe istologica: *carcinomi midollari* (5% dei casi).

Il *papillare* e il *follicolare* hanno una buona prognosi ed il trattamento di elezione è rappresentato dalla resezione chirurgica del tumore, seguito da chemio o radioterapia. L'*anaplastico*, invece, ha una prognosi sfavorevole dovuta all'elevata invasività ed insensibilità al trattamento con iodio radioattivo (isotopo 131), in quanto non esprime la proteina di simporto dello iodio(NIS).¹

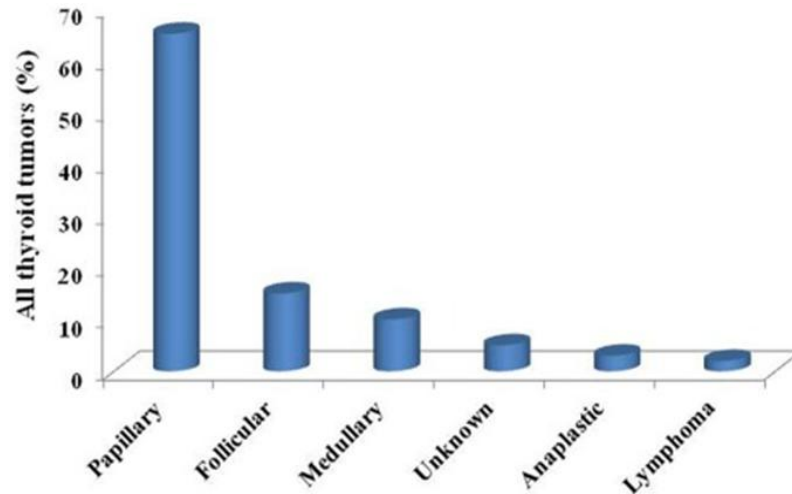


Figura 1. Prevalenza dei differenti istotipi di carcinoma tiroideo. (Romei C., et al. *RET/PTC translocations and clinico-pathological features in human papillary thyroid carcinoma. Frontiers in Endocr.*, 2012).

Carcinoma papillare della tiroide

La tipologia più comune di carcinoma tiroideo è il *carcinoma papillare*.

In fase molto precoce si presenta sotto forma di *microcarcinoma* (focolaio tumorale inferiore ad un centimetro), che può esprimere la sua malignità mediante formazione di metastasi ai linfonodi latero-cervicali che spesso costituiscono la prima manifestazione clinica della malattia. Le metastasi in altri organi sono rare (1% dei casi); gli organi coinvolti sono il polmone, le ossa, il sistema nervoso centrale, il pancreas e la mammella. Microscopicamente, il tumore è formato dalla proliferazione delle *cellule follicolari* che formano papille con caratteristiche morfologiche tipiche (Figura 2):

- *nuclei chiari*;
- *pseudoinclusioni nucleari* o invaginazioni del citoplasma nucleare che appaiono come piccole sfere viola;
- *grooves*, addensamenti della membrana nucleare che appaiono come sottili bastoncelli disposti lungo l'asse maggiore del nucleo;
- *i corpi psammomatosi*, piccole sfere di calcio espressione di papille morte che degenerandosi liberano una sostanza cellulare che poi calcifica.²

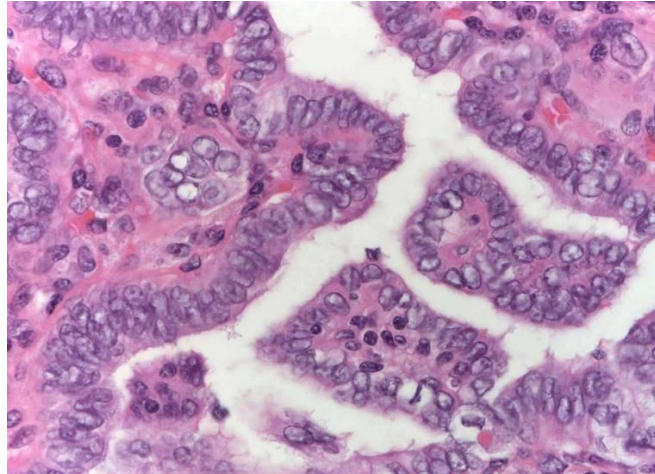


Figura 2. Carcinoma papillare della tiroide. (Parente P. Endocrinologia oggi. Tumori della tiroide anatomia patologica).

Le alterazioni genetiche trovate nel *carcinoma papillare* coinvolgono gli effettori della via di segnalazione delle MAPK. I geni mutati codificano per recettori transmembrana tirosin chinasi, quali RET (*rearranged during transfection*) e Ntkr1 (*neurotrophic tyrosine kinase receptor*) e due trasduttori del segnale, Ras e la serina/treonina chinasi B-Raf.³⁻⁸

Le mutazioni a carico del gene *BRAF* si ritrovano nel 23-62% dei carcinomi papillari.

Il riarrangiamento genico *RET/PTC* è presente nel 20% dei carcinomi sporadici dell'adulto, nel 70-90% dei tumori post Chernobyl e nel 40-70% dei *papillari* in bambini e giovani adulti.⁹

Le mutazioni a carico del gene *RAS* si hanno nella variante follicolare del carcinoma *papillare* che presenta caratteristiche nucleari meno spiccate rispetto al *papillare*, una frequente incapsulazione del tumore e un basso tasso di metastasi ai linfonodi (Figura 3).

Come per tutti i tumori tiroidei, la causa del *carcinoma papillare* è sconosciuta. Tuttavia esistono dei fattori di rischio per lo sviluppo del tumore della tiroide come le radiazioni ionizzanti, la carenza iodica, autoimmunità, familiarità.¹⁰

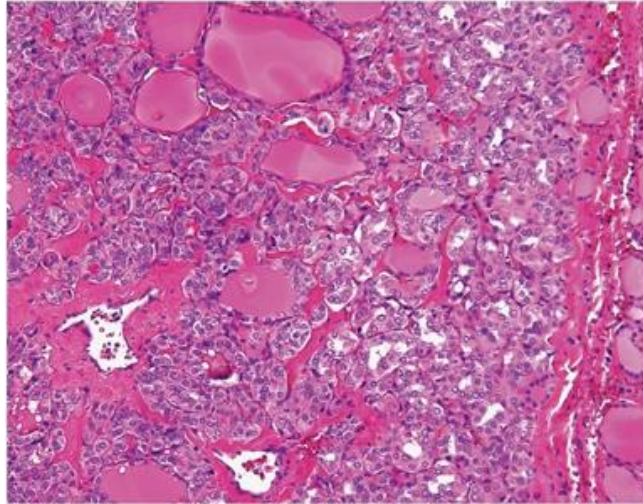


Figura 3. Variante follicolare del carcinoma papillare tiroideo. (Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. Modern path., 2011).

Carcinoma follicolare della tiroide

Il *carcinoma follicolare* della tiroide si presenta come un nodulo della tiroide del diametro variabile tra pochi millimetri a qualche centimetro e può essere più o meno dotato di una capsula. Si diffonde principalmente per via ematica dando a distanza metastasi (ossa e polmoni), e solo tardivamente per via linfatica.

Microscopicamente, il tumore è costituito da una proliferazione di follicoli neoplastici che invadono la capsula tumorale andando all'interno dei vasi ematici come emboli neoplastici endovascolari o nel tessuto tiroideo normale adiacente.²

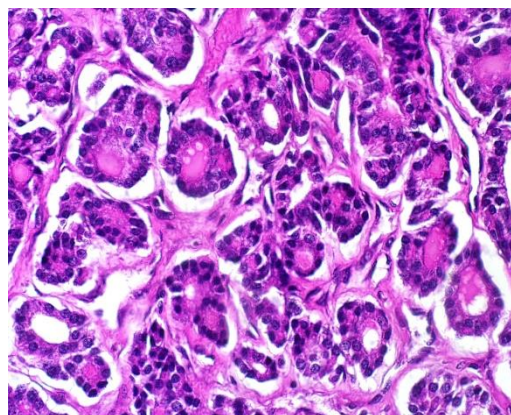


Figura 4. Carcinoma follicolare della tiroide.

Le più frequenti alterazioni genetiche dei carcinomi follicolari includono le mutazioni puntiformi del gene *RAS*, presenti nel 40-50% dei carcinomi *follicolari* e la fusione genica *PAX8/PPAR γ* , conseguente a traslocazione cromosomica, presente nel 30-40% dei carcinomi *follicolari*. Nello specifico, *PAX8/PPAR γ* , determina la deregolazione della funzione del gene *PAX8*, fondamentale per il corretto differenziamento delle cellule tiroidee e l'overespressione del gene *PPAR γ* coinvolto nella regolazione del differenziamento cellulare.^{11,12}

Carcinoma anaplastico della tiroide

Il *carcinoma anaplastico* è la neoplasia tiroidea caratterizzata da rapido accrescimento e invasione delle strutture contigue; in breve tempo diffonde infiltrando la trachea, l'esofago e il mediastino causando spesso emorragia, soffocamento così come metastasi a distanza, particolarmente al polmone, alle ossa e all'encefalo. Microscopicamente, il tumore è formato da una proliferazione di cellule atipiche epiteliali e da cellule atipiche mesenchimali, che possono crescere in nidi, papille o trabecole (Figura 5). L'insorgenza è tipica in soggetti anziani, già portatori di altre lesioni neoplastiche tiroidee di tipo papillare o follicolare clinicamente silenti.²

Quando la cellula tumorale, già portatrice delle mutazioni a carico dei geni *RET*, *BRAF* o *RAS* che caratterizzano il carcinoma *papillare* o *follicolare*, acquisisce anche la mutazione del gene *TP53*, assume tutti i caratteri tipici del carcinoma *anaplastico*, quali la sua caratteristica malignità e aggressività.^{13,14}

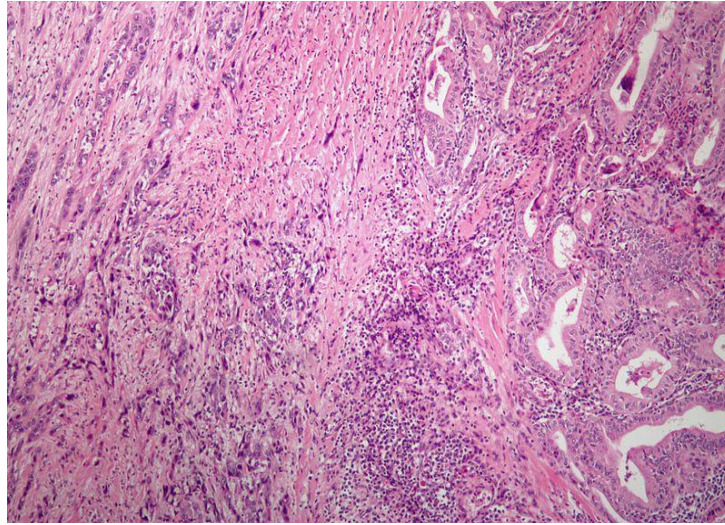


Figura 5. Carcinoma anaplastico della tiroide. (En.wikipedia.org).

Mutazioni genetiche nei carcinomi tiroidei

Il *carcinoma papillare* origina dalle mutazioni puntiformi a carico dei geni *BRAF*, *RAS* e dal riarrangiamento genico *RET/PTC*, tutti effettori della via di segnalazione delle MAPK, fondamentale per la regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare.¹⁵⁻¹⁹

Il *carcinoma follicolare* origina principalmente dalle mutazioni a carico del gene *RAS* e dal riarrangiamento cromosomico *PAX8/PPAR γ* ²⁰. La mutazione del gene *TP53* risulta correlata con l'insorgenza del *carcinoma anaplastico*.²¹

RET

Il proto-oncogene *RET* (*rearranged during transfection*) codifica per un recettore tirosin chinasi che lega una serie di molecole segnale appartenenti alla famiglia GDNF (fattori di crescita delle cellule gliali) trasducendo segnali di crescita e di differenziamento.

È espresso ad elevati livelli nelle *cellule parafollicolari C*, ma non nelle *cellule follicolari* dove, invece, viene attivato in seguito a riarrangiamento cromosomico. Il riarrangiamento genico più frequente è *RET/PTC1* che deriva dalla fusione tra la porzione 3' del gene codificante il recettore tirosin chinasi *RET* e la porzione 5' terminale del gene *CCD6* o *H4* (Figura 6).²²

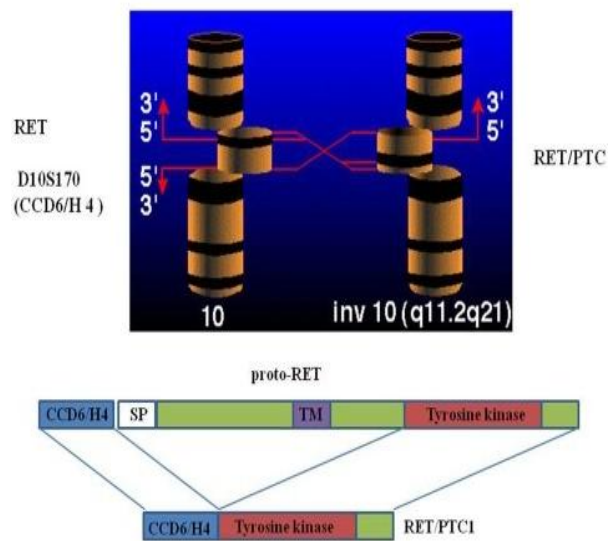


Figura 6. Rappresentazione del riarrangiamento genico e della struttura di RET/PTC1. (Romei C., et al. RET/PTC traslocations and clinico-pathological features in human papillary thyroid carcinoma. *Frontiers in Endocr.*, 2012).

Il gene chimerico venutosi a creare, determina l'espressione costitutiva e la dimerizzazione ligando-indipendente della proteina RET/PTC1, con conseguente stimolazione cronica della via di segnalazione delle MAPK (Figura 7).^{23, 24}

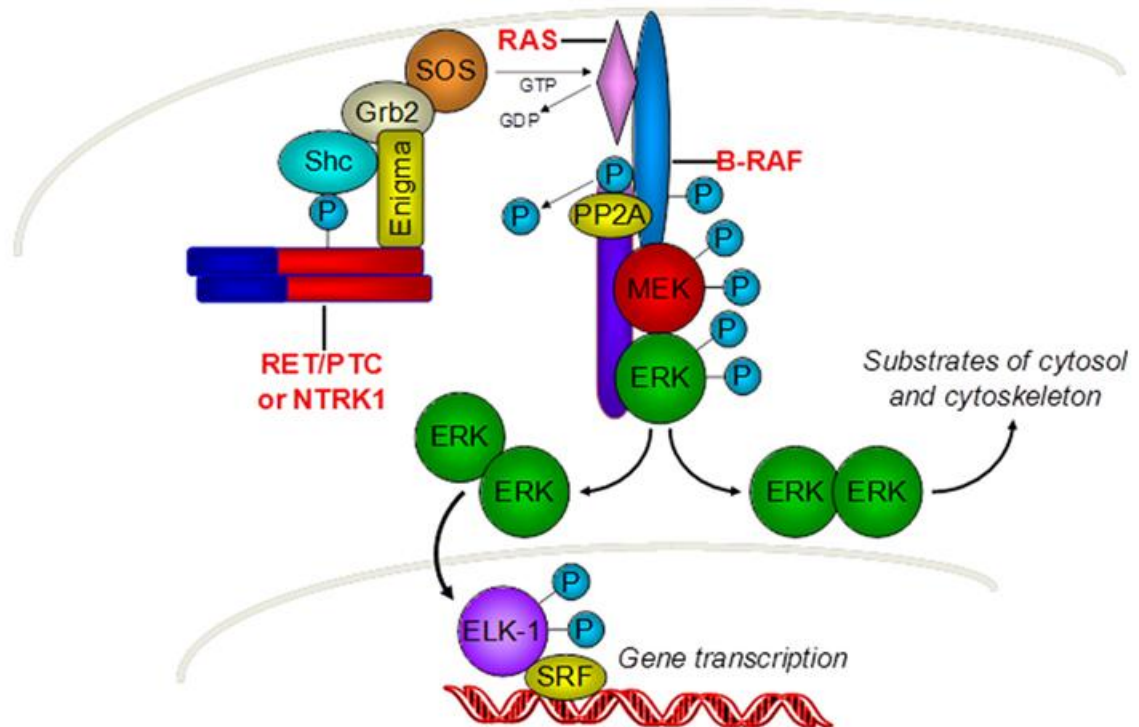


Figura 7. Via di segnalazione mediate da RET e RET/PTC1. (Menicali et al. *Intracellular signal transduction and modification of the tumor microenvironment induced by RET/PTCs in papillary thyroid carcinoma: Front. End., 2012*).

RET/PTC1 lega l'adattore proteico Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), che insieme a Sos (guanine nucleotide exchange factor) attiva Ras; il suo effettore è la chinasi B-Raf che attiva la via delle MAPK. Esistono diversi regolatori negativi di questo pathway, il cui ruolo nella via di segnalazione innescata da RET/PTC1, non è stato ancora chiarito.²⁵ Studi recenti suggeriscono che RET/PTC1 è tumorigenico, in quanto è in grado di trasformare cellule normali tiroidee in tumorali e di iniziare un carcinoma tiroideo in topi transgenici. Gli xenograft risultanti mostrano l'aspetto istologico tipico del carcinoma *papillare*, in particolare le *pseudoinclusioni nucleari* e la presenza di un'invasione tumorale locale.^{26,27}

BRAF

La proteina B-Raf è una serina/treonina chinasi coinvolta nella via di segnalazione delle MAPK. Delle tre diverse isoforme funzionali descritte nell'uomo (A-Raf, B-Raf, C-Raf), B-Raf è il più potente attivatore di MEK (MAPKK extracellular signal regulated kinase) ed è richiesto per il mantenimento della sua attività basale.^{28,29}

Le tre isoforme condividono tre regioni conservate: *CR1*, *CR2*, *CR3*.

La regione *CR1* (porzione N-terminale) esercita un'azione autoinibitoria sul dominio chinasi *CR3* ed è richiesta per il reclutamento e l'attivazione di B-Raf a livello della membrana. In particolare, contiene il dominio legante Ras-GTP (*RBD*) e il dominio ricco in cisteina (*CRD*), fondamentale per stabilizzare il legame con Ras grazie all'interazione con la coda lipidica presente nella GTPasi. Mutazioni in questo dominio impediscono il legame di B-Raf a Ras rendendo la chinasi insensibile ai segnali extracellulari.

La *CR2*, regione di legame tra *CR1* e *CR3*, contiene un sito di fosforilazione (*S365*) per il legame alla proteina *14-3-3*.

La regione *CR3*, è formata da due lobi separati da una tasca di legame per l'ATP (*catalytic cleft*): il lobo *N* responsabile del legame con l'ATP ed il lobo *C* che lega le proteine substrato. Questa regione contiene il dominio C-terminale con attività catalitico chinasi; il segmento di attivazione (*activation segment*), il P-loop (*N-region*), il dominio ricco in glicina (*DFG*), il loop catalitico (*catalytic loop*) e un secondo sito di legame (*S729*) per la proteina *14-3-3*. Mutazioni in questo dominio influiscono sull'attività biologica di B-Raf (Figura 8).³⁰⁻³²

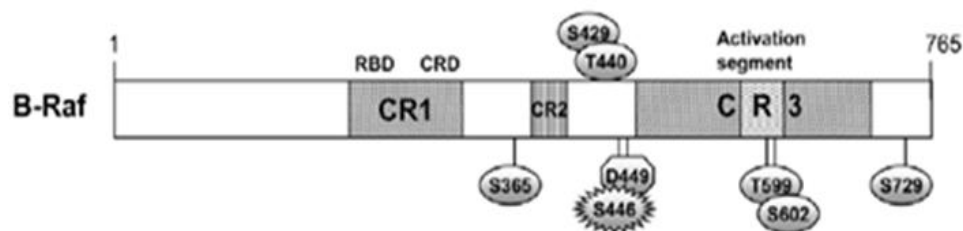


Figura 8. Rappresentazione della struttura della proteina B-Raf. (Kam-Tsung-Tang. *BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implication. J. Chin Med. Assoc., 2010*).

Nella conformazione inattiva di B-Raf, il dominio conservato *DFG* (aspartato, fenilalanina, e glicina) mostra una conformazione capovolta che orienta il segmento di attivazione verso il P-loop dell'*N-region*. Questa conformazione, stabilizzata dal legame

con 14-3-3, determina interazioni idrofobiche tra il segmento ricco in glicina *DFG* e la *tasca di legame* per l'ATP rendendo inaccessibile il dominio catalitico.³³

I residui richiesti per la reazione di fosforilazione sono allineati, ma i segmenti di riconoscimento del substrato e dell'ATP sono disorganizzati, quindi per l'attivazione è richiesto il cambiamento conformazionale del motivo *DFG/segmento di attivazione* (Figura 9).³²

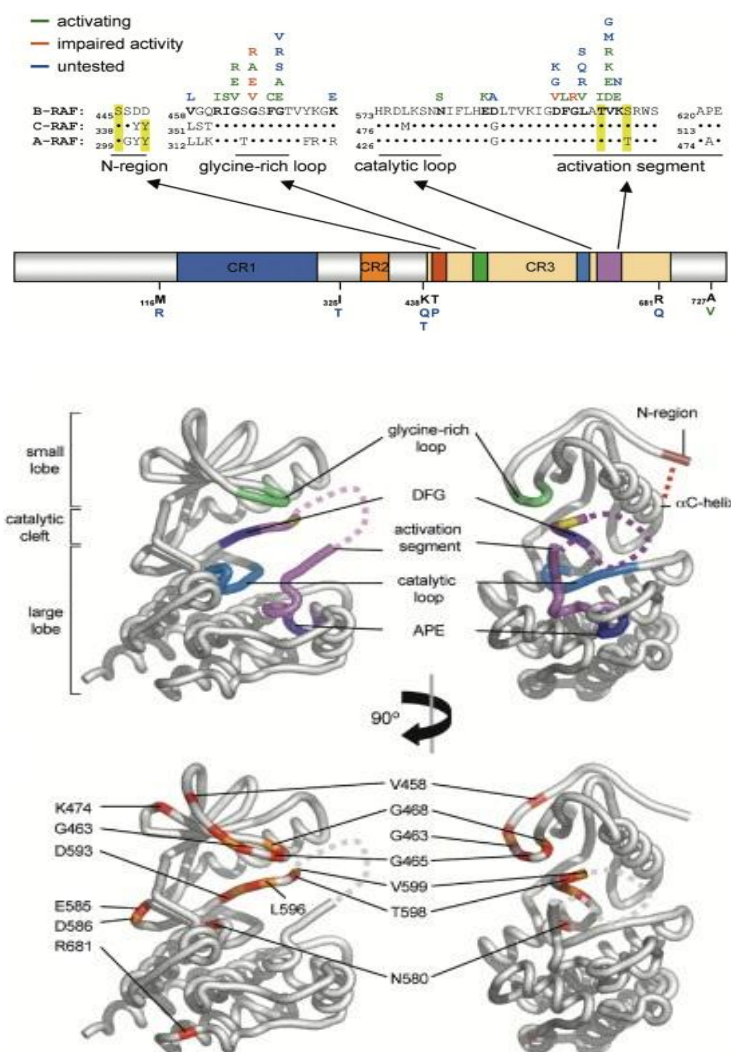


Figura 9. Struttura dei domini della chinasi B-Raf. B-Raf wild type (in alto), l'N-region (ruggine) interagisce con il P-loop (C-helix). Loop catalitico (blu), segmento di attivazione (magenta), DFG (viola), il sito di fosforilazione attivatoria è in giallo. Una porzione del segmento di attivazione è disorganizzata ed è indicata con la linea tratteggiata magenta. La proteina B-Raf mutata (in basso), i residui mutati sono colorati in arancio o rosso. (Garnett M., et al. *Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. Cancer Cell*, 2004).

L'attivazione di B-Raf inizia con il reclutamento della proteina inattiva sul versante intracellulare della membrana e con il legame a Ras-GTP. La chinasi prima di interagire con Ras-GTP viene preattivata dalla fosforilazione in un residuo di *serina* (S446). Il legame con Ras-GTP determina un cambiamento conformazionale che favorisce l'ulteriore fosforilazione di residui regolatori (T599, S602) presenti nel *segmento di attivazione* e nel *P-loop*. La fosforilazione destabilizza l'interazione idrofobica tra il *segmento di attivazione* e il *P-loop* determinando lo switch del motivo DFG, l'allineamento dei segmenti di riconoscimento del substrato e dell'ATP e la piena attivazione dell'attività chinasi (Figura 10).³⁴

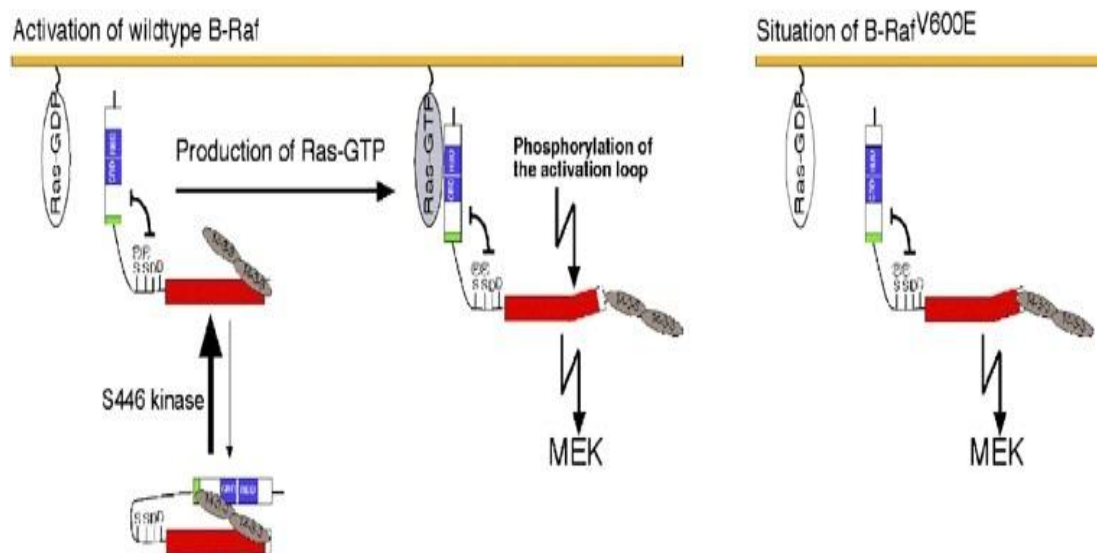


Figura 10. Modello di attivazione sequenziale di B-Raf wild type e B-Raf^{V600E}.

B-Raf wild type è preattivata tramite fosforilazione del residuo S446. Il legame con Ras-GTP determina l'apertura della proteina, il rilascio della proteina 14-3-3 legata al residuo S365 e lo switching di B-Raf verso una conformazione che permette la fosforilazione e il cambio conformazionale del segmento di attivazione. Questo ultimo step è mimato dalla mutazione V600E, che attiva la proteina indipendentemente dalla fosforilazione in S446 e dal legame con Ras-GTP. (Brummer T., et al. Functional analysis of the regulatory requirements of BRAF and BRAFV600E oncoprotein. Oncogene, 2006).

Nella conformazione aperta, B-Raf espone il sito di legame a MEK (MAP2K1), che viene fosforilata e attivata innescando così la via di segnalazione delle MAPK.³⁵

Target di questa via comprendono fattori trascrizionali come ad esempio, c-Myc, Ets, CREB, Jun e Fos, che attivano geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'apoptosi, nella sopravvivenza cellulare, nell'embriogenesi, nel differenziamento e senescenza cellulare (Figura 11).²⁸

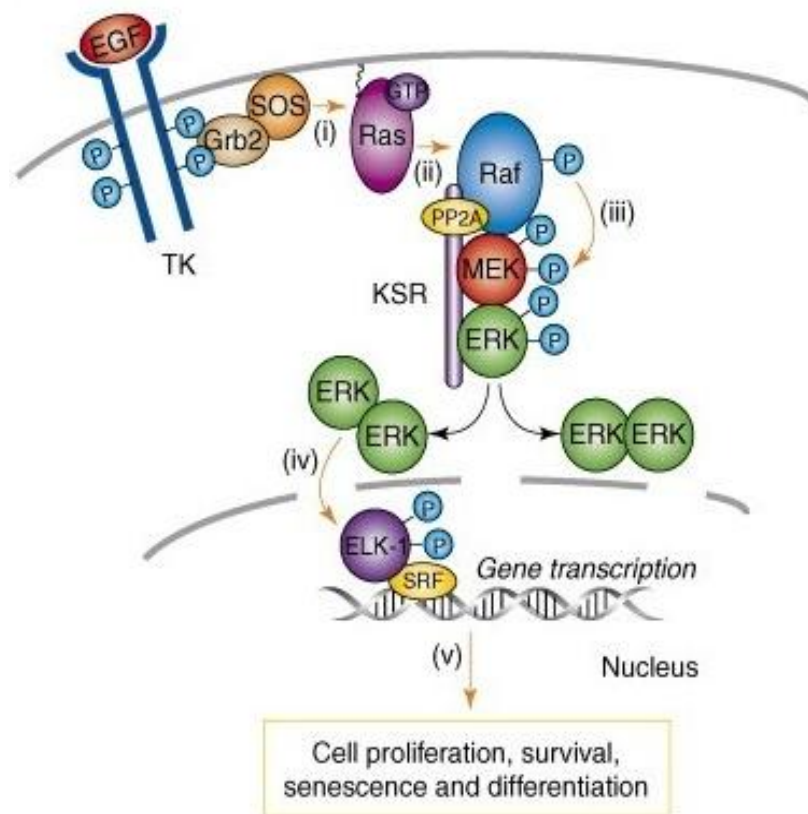


Figura 11. Regolazione della via di segnalazione delle MAPK in condizioni fisiologiche. (Puxeddu E., et al. *Clinical implication of BRAF mutation in thyroid carcinoma. Cell Trend in Endocr. e Metab.*, 2008).

La mutazione più frequente del gene *BRAF*, che consiste in una trasversione timina-adenina (*T1799A*) nel codone 600, causa la sostituzione di una *valina* con *acido glutammico* nella sequenza amminoacidica della proteina (B-Raf^{Val600Glu}).^{36,37}

La *valina 600* è localizzata nel *segmento di attivazione* vicino il *motivo DFG* e la sua sostituzione con l'acido glutammico impedisce l'interazione tra i due segmenti

destabilizzando la conformazione inattiva della proteina. Questa mutazione mima il cambiamento conformazionale del *segmento di attivazione* indotto normalmente dalla fosforilazione dei residui T599 e S609 (Figura 8). Così, la fosforilazione in S446 e il legame a Ras diventano superflui per l'attivazione della via di segnalazione delle MAPK (Figura 12).^{33,34}

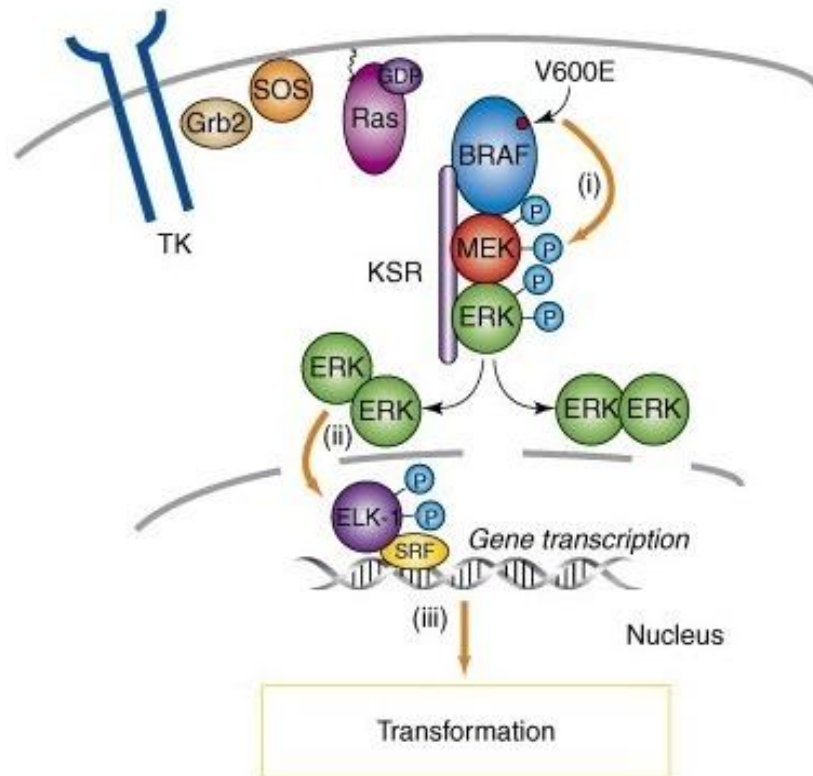


Figura 12. Regolazione della via di segnalazione delle MAPK in presenza di $B\text{-Raf}^{V600E}$. (Puxeddu E., et al. *Clinical implication of BRAF mutation in thyroid carcinoma. Cell Trend in Endocr. e Metab.*, 2008).

Esperimenti su topi transgenici per $BRAF^{V600E}$ mostrano lo sviluppo di tumori tiroidei con caratteristiche microscopiche tipiche del carcinoma *papillare* umano e rivelano anche un'invasione dei vasi sanguigni e della capsula tiroidea e progressioni multifocali verso il carcinoma indifferenziato (Figura 13).³⁸

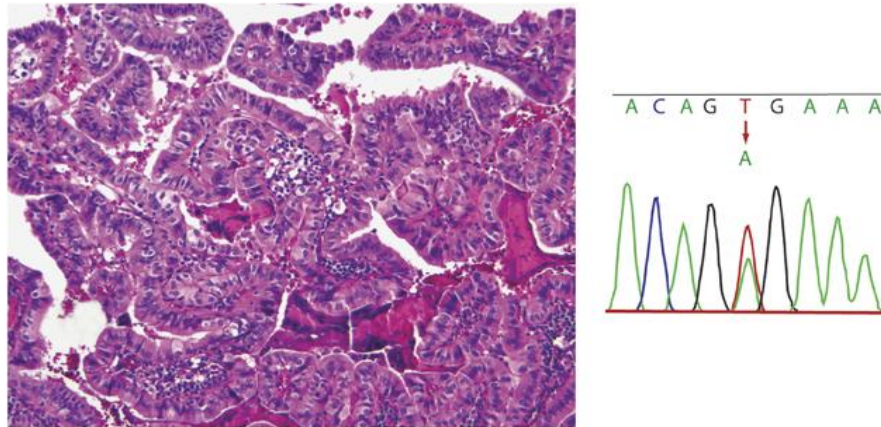


Figura 13. Microscopia Carcinoma Papillare (sinistra). Il tumore è positivo per la mutazione nel gene *BRAF* codone 600 (GTG → GAG) (destra). (Nikiforov YE. *Molecular analysis of thyroid tumors. Modern path., 2011*).

E' stato inoltre scoperto che la mutazione nel gene *BRAF* avviene precocemente nella tumorigenesi delle cellule tiroidee e predispone le cellule tumorali ad acquisire anomalie genetiche aggiuntive che possono guidare la *dedifferenziazione* attraverso l'attivazione di diverse vie di segnalazione.³⁹

L'espressione condizionale della proteina B-Raf^{V600E} nella linea cellulare PCCL3 (tireociti differenziati di ratto) induce *dedifferenziazione* e instabilità genomica che aumentano la probabilità di mutazioni genetiche secondarie.⁴⁰

La *dedifferenziazione* è dovuta alla downregolazione dell'espressione del TSHR (thyroid stimulating hormone receptor), di TTF-1 (thyroid transcriptional factor) e di proteine coinvolte nel metabolismo dello iodio, come il trasportatore Na/I, la tireoglobulina (Tg) e la tireoperossidasi (TPO).⁴¹ B-Raf^{V600E} inoltre induce l'espressione di metalloproteinasi di matrice, quali MMP3, MMP9 e MMP13, che determinano un aumento della capacità invasiva delle cellule che portano questa mutazione.⁴²

RAS

I tre geni umani *RAS* codificano per piccole proteine molto simili tra loro chiamate H-Ras, N-Ras e K-Ras, dotate di attività GTPasica e residenti sul versante interno della membrana plasmatica, esse hanno un ruolo cruciale nel regolare la crescita cellulare, la proliferazione e il differenziamento. Le tre isoforme interagiscono con un comune set di

modulatori ed effettori ma generano segnali cellulari diversi dovuti principalmente alla loro diversa compartimentalizzazione e localizzazione cellulare.⁴³

La via di segnalazione inizia con il legame di un fattore di crescita ad un *recettore tirosin chinasi* (RTK) posto sulla membrana plasmatica. Il recettore dimerizza e tramite autofosforilazione crociata si attiva. Le fosfotirosine del recettore fungono da sito di ancoraggio per il *dominio SH2* della proteina adattatrice Grb2, che tramite il suo dominio *SH3* si lega alla proteina Sos attivandola. Sos (GEF di Ras) è quindi portata nelle vicinanze della membrana plasmatica dove può legarsi a Ras determinando lo scambio del GDP con il GTP, la sua attivazione e l'innesco della cascata di attivazione delle MAPK (Figura 14).^{44,45}

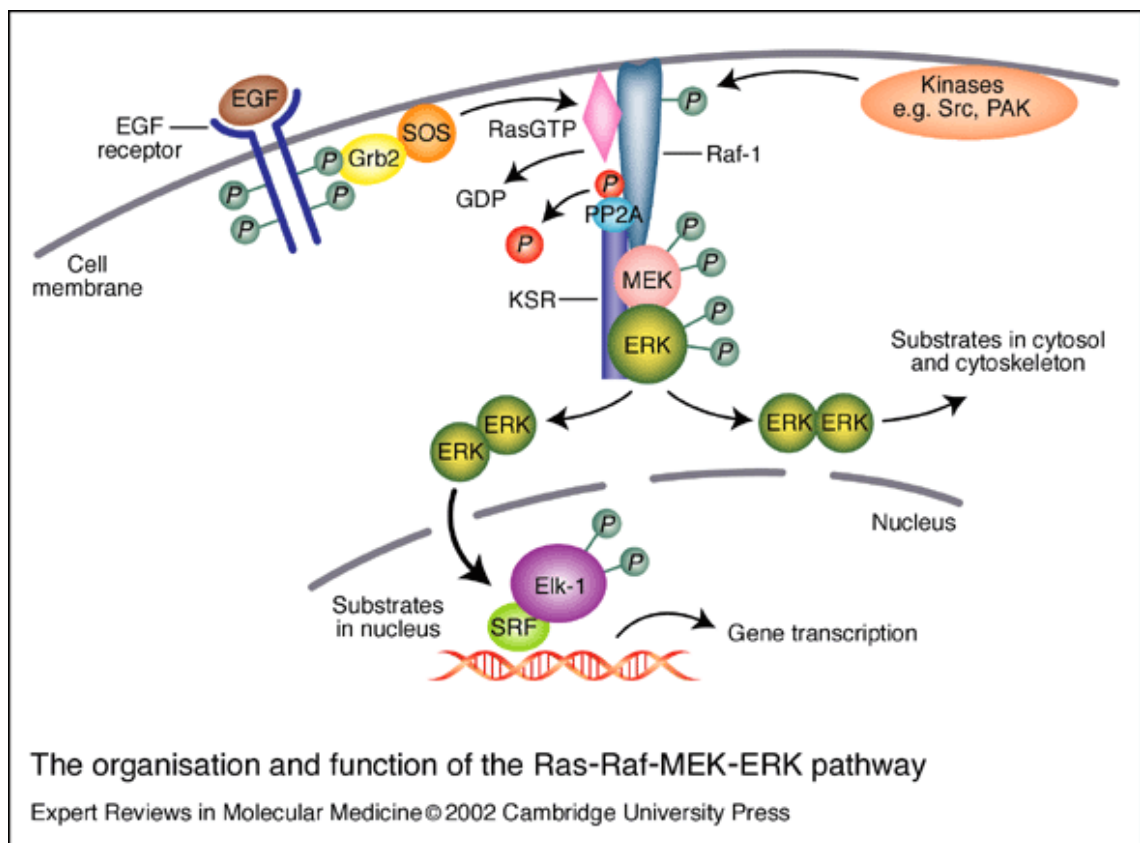


Figura 14. Via di segnalazione mediata da Ras.

Molte mutazioni del gene *RAS* guidano la tumorigenesi. In media il 16% dei tumori umani originano da mutazioni che determinano un aumento della sua affinità per il GTP (*codoni 12 e 13*) o una riduzione della sua funzione autocatalitica GTPasica (*codone 61*), portando all'attivazione costitutiva di Ras e delle MAPK.⁴⁶ In particolare, le

mutazioni puntiformi che coinvolgono il *codone 61* (glutamina → arginina) di *NRAS* sono le più comuni alterazioni genetiche trovate nella variante *follicolare* del *carcinoma papillare* (Figura 15).³⁸

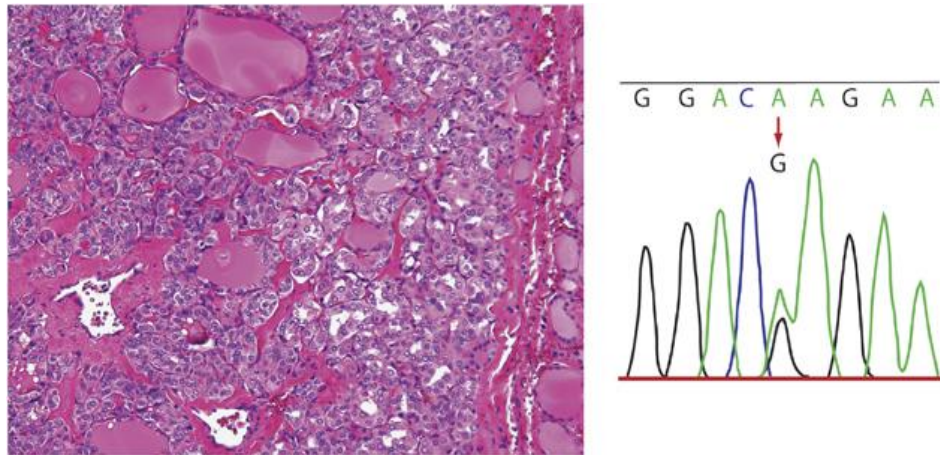


Figura 15. Microscopia variante follicolare del carcinoma papillare (sinistra). Il tumore è positivo per la mutazione nel gene *NRAS* codone 61 (CAA → CAG) (destra). (Nikiforov YE. *Molecular analysis of thyroid tumors. Modern path., 2011*).

TP53

Il gene oncosoppressore *TP53*, che risulta mutato nel 50% dei tumori umani, codifica per una proteina di 393 amminoacidi che gioca un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità strutturale del genoma attraverso il controllo del ciclo cellulare, dell'apoptosi, della riparazione del danno al DNA e dell'angiogenesi.

Tra i geni target troviamo *P21*, inibitore delle chinasi ciclina-dipendente, che è in grado di arrestare il ciclo cellulare, *BAX* e *PUMA*, membri della famiglia Bcl-2 che promuovono l'apoptosi, *MDM2* codificante per una ubiquitina ligasi che lega l'estremità N-terminale della proteina p53 causandone l'inattivazione, l'esporto nucleare e la sua degradazione. L'induzione della trascrizione di *MDM2* da parte di p53 rappresenta un loop negativo di regolazione che blocca l'attività proapoptotica di p53 e consente alla cellula di riparare il danno al DNA.⁴⁷

Le cellule che esprimono le forme mutate di p53 mostrano un aumento del potenziale tumorigenico e maggior resistenza alla chemioterapia e radioterapia.

La proteina presenta tre domini funzionali conservati: il dominio N-terminale di *transattivazione (TAD)*, il *dominio ricco in prolina*, il dominio *core* che lega il DNA (*DBD*) e il dominio C-terminale di *oligomerizzazione (OD)*.

Sono stati identificati otto hot spot mutazionali nel *DBD* (i codoni 175, 176, 220, 245, 248, 249, 273 e 282) che determinano l'abrogazione dell'attività *wild-type* della proteina p53 (Figura 16).⁴⁷

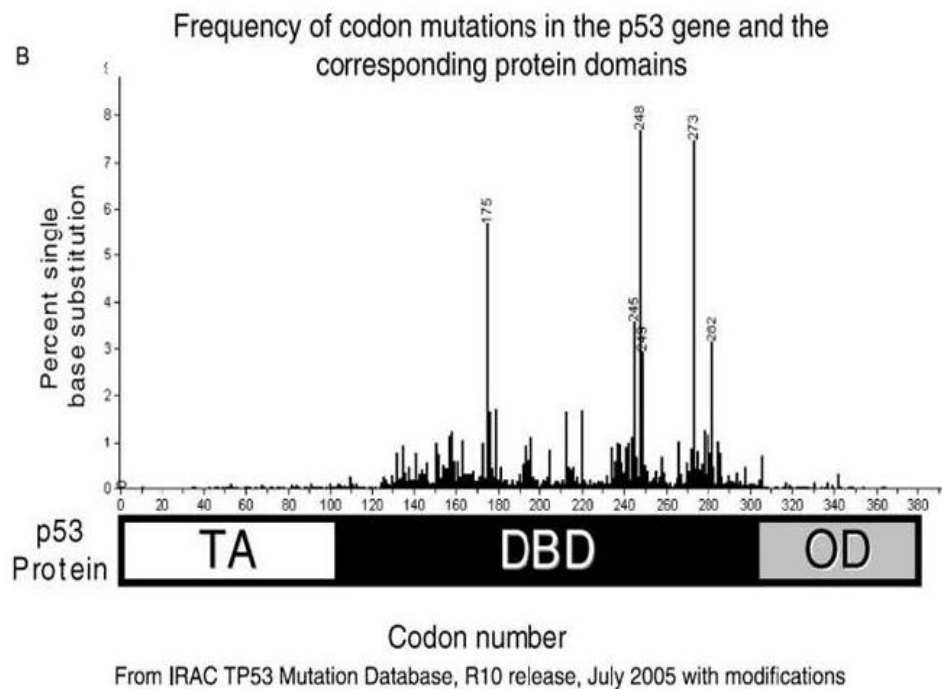


Figura 16. Frequenza di mutazione dei diversi codoni del gene TP53. (Malaguarnera R., et al. *p53 family protein in thyroid cancer. Endocrine-Rel. Cancer* 2007).

A differenza di altri tumori umani, le mutazioni a carico del gene *TP53* sono poco frequenti nei carcinoma tiroidei (10%) e rappresentano un evento tardivo nella progressione tumorale (Figura 17).⁴⁹

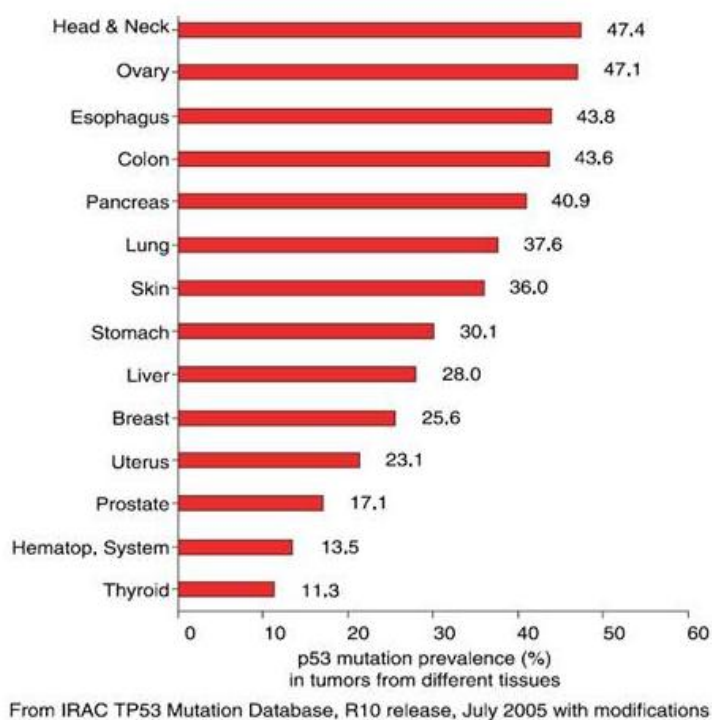


Figura 17. Frequenza delle mutazioni di p53 in differenti tipi di tumore. (Malaguarnera R., et al. *p53 family protein in thyroid cancer. Endocrine-Rel. Cancer* 2007).

Soltanto il 5% di adenomi follicolari presenta la forma mutata e indagini immunoistochimiche hanno messo in evidenza l'accumulo sia della forma *wild-type* che della forma mutata, nonostante ciò in entrambi i casi la sua attività risulta compromessa. L'inattivazione di p53 avviene attraverso vari meccanismi quali l'overespressione di *MDM2*, l'alterazione dell'interazione di p53 con Mdm2 e la sua mancata degradazione o la ritenzione citoplasmatica della proteina.

Mutazioni diverse di p53 sembrano avere differenti effetti biologici sono legate allo sviluppo e alla progressione tumorale; tuttavia la funzione della forma mutata nei carcinomi tiroidei risulta ancora poco conosciuta.⁵⁰

Cellula staminale: normale vs tumorale

Recenti scoperte avvalorano l'ipotesi che il carcinoma tiroideo origina da una sottopopolazione di cellule tumorali che possiedono caratteristiche staminali, la capacità di mediare le metastasi e di resistere agli effetti della chemioterapia e radioterapia.⁵¹

La definizione classica di cellula staminale richiede che una cellula possieda due proprietà fondamentali: *l'autorinnovamento e la potenza*.

L' autorinnovamento (Figura 18) rappresenta l'abilità di una cellula di perpetuare se stessa attraverso diversi cicli di divisione, pur mantenendo uno stato indifferenziato. I due meccanismi che assicurano il mantenimento del pool delle cellule staminali sono:

- *la divisione asimmetrica*, in cui la cellula staminale si divide generando una cellula identica a se stessa ed una cellula *progenitrice (PG) o transient-amplifying cell (TAC)* destinata a differenziare;⁵²
- *la divisione simmetrica*, in cui una cellula staminale normale si divide dando vita a due cellule figlie identiche a se stessa.⁵²

La cellula staminale normale predilige la divisione asimmetrica. Alterazioni genetiche ed epigenetiche possono trasformare una cellula staminale normale (*CSN*) in una cellula staminale tumorale (*CST*) che, dividendosi sia simmetricamente che asimmetricamente, darà origine a cellule *non tumorigeniche/non metastatiche (PG/TAC)* e *tumorigeniche* con potenziale metastatico (*CST*).⁵¹

Basandosi sul numero delle divisioni cellulari, il pool delle cellule staminali può essere diviso in due gruppi :

- *high-cycling cells*, rappresentano cellule che si dividono con frequenza e assicurano la normale omeostasi di un tessuto;
- *slow-cycling cells*, cellule staminali con un basso tasso di proliferazione che dividendosi asimmetricamente danno origine ad una nuova cellula staminale e ad una progenitrice, mantenendo così il pool di cellule staminali nei vari tessuti dell'organismo adulto.⁵⁵

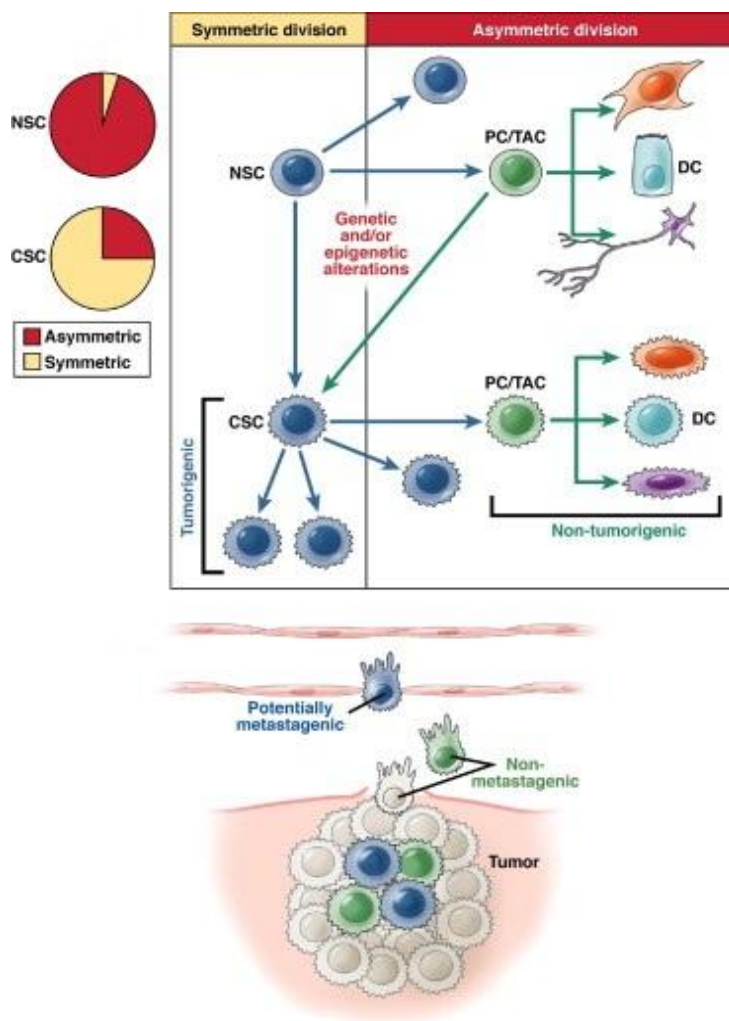


Figura 18. Divisione cellulare di cellule staminali normali (CS) e cellule staminali tumorali (CST). (Todaro M., et al. Colon Cancer Stem Cells: Promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 2010).

La seconda caratteristica fondamentale che contraddistingue le cellule staminali è la loro capacità di differenziare in tipi cellulari specifici con funzioni particolari, detta *potenza* (Figura 19). Sulla base di questa proprietà, le cellule staminali sono classificate in:

- *totipotenti*: presenti solo nelle prime fasi di formazione dell'embrione, sono in grado di generare un intero organismo e i tessuti extraembrionali;
- *pluripotenti*: cellule staminali che originano dalle totipotenti e che daranno origine ai tre foglietti embrionali; possono formare qualunque tipo di cellule ma non possono formare un organismo intero, così come non possono generare i tessuti extraembrionali;

- *multipotenti*: conservano una certa capacità di specializzarsi, ma inferiore alle pluripotenti, sono in grado di differenziare in tipi cellulari specifici di un tessuto;
- *unipotenti*: cellule staminali che producono un solo tipo cellulare specifico e che conservano la capacità di autorinnovamento, possono replicarsi all'infinito per rinnovare un tessuto.⁵⁶

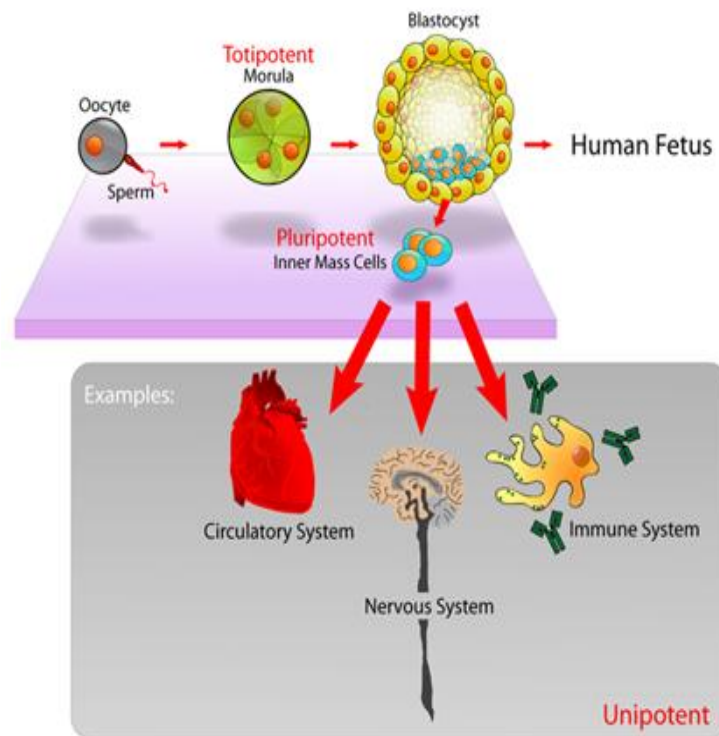


Figura 19. La potenza di una cellula specifica il suo potenziale di differenziamento. (En.wikipedia.org).

Il processo di trasformazione maligna che porta una cellula staminale o progenitrice a diventare tumorale consiste in una serie di mutazioni genetiche a carico di oncogeni e oncosoppressori che stravolgono i normali cicli di divisione o il differenziamento cellulare. È più facile che tale processo avvenga in una cellula staminale, in quanto vive più a lungo ed è più facile che accumuli nel tempo mutazioni genetiche multiple tale da diventare tumorale. Le cellule staminali tumorali (*CST*) possiedono la capacità di generare tumori attraverso i processi tipici delle cellule staminali normali di autorinnovamento e differenziazione in tipi cellulari differenti. Queste cellule sono

preposte a persistere nel tumore come popolazione distinta e a causare la comparsa di metastasi e recidive.

Le prime *CST* sono state scoperte nelle leucemie e sono state riconosciute per la caratteristica di ricreare la leucemia umana nei topi da laboratorio. Le cellule staminali leucemiche si sono rivelate somiglianti alle cellule staminali del sangue presenti nelle persone sane. La somiglianza tra cellule staminali tumorali e cellule staminali normali è stata osservata anche in altri tumori, come quelli dell'intestino e cervello. Da questa osservazione è nata l'ipotesi sull'origine delle cellule staminali tumorali: le staminali tumorali derivano dalle staminali del tessuto stesso in cui il tumore si è sviluppato. In seguito è stato visto che le cellule staminali tumorali possono derivare anche da una sottopopolazione di cellule chiamate *progenitori*. Queste sono i primi discendenti della cellula staminale, hanno una grande capacità di dividersi ma dopo un determinato numero di divisioni muoiono. Se una cellula progenitrice va incontro a trasformazione maligna può acquisire l'immortalità e diventare una cellula staminale tumorale (Figura 20).⁵⁶

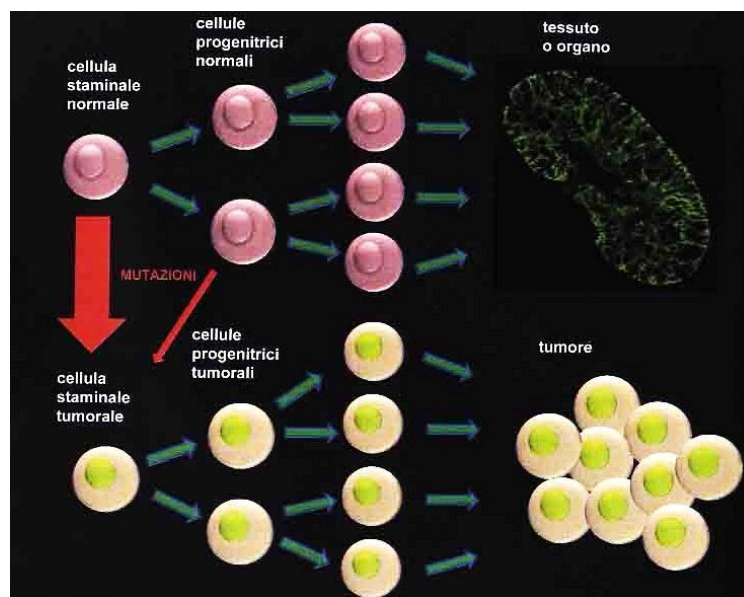


Figura 20. Le cellule staminali tumorali possono derivare da cellule staminali normali o da cellule progenitrici. (Zeuner A., Palio E. *Le cellule staminali: spunti per un'azione didattica*).

Le *CST* sono delle cellule presenti in piccola quantità all'interno di un tumore e hanno tre principali caratteristiche:

- sono fondamentali per la crescita del tumore perché generano tutte le altre cellule tumorali;
- sono resistenti ai farmaci;
- sono responsabili della formazione di metastasi.

La presenza delle *CST* nella maggior parte dei tumori sembra essere la causa principale del fallimento della chemioterapia convenzionale e della comparsa delle recidive.

La chemioterapia convenzionale colpisce la maggior parte delle cellule presenti nel tumore ma non le *CST* che rimanendo in sede sono causa di recidive. Per questa ragione, la ricerca scientifica si propone di identificare e isolare le *CST* al fine di conoscere le alterazioni genetiche che guidano sia la trasformazione di cellule staminali in cellule staminali tumorali sia la loro chemioresistenza allo scopo di sperimentare terapie più efficaci.⁵⁶

Le cellule staminali tumorali sono state trovate in molti tumori compresi i carcinomi tiroidei.

Modelli di carcinogenesi tiroidea

Negli ultimi anni sono stati formulati vari modelli per spiegare l'oncogenesi del Carcinoma Tiroideo.

Il *modello classico di carcinogenesi multistep* (Figura 21) sostiene che il *tireocita*, attraverso mutazioni genetiche multiple in oncogeni e oncosoppressori, può *dedifferenziare* ed acquisire un fenotipo tumorale. Secondo questo modello, il *carcinoma anaplastico* deriva da *cellule follicolari* e *papillari tumorali* attraverso l'accumulo di mutazioni genetiche acquisite durante la proliferazione delle *cellule follicolari mature*. Questi eventi, sono accompagnati da un processo di *dedifferenziazione* che si manifesta quando le cellule acquisiscono mutazioni del gene *TP53* ed un fenotipo neoplastico caratterizzato da una marcata transizione epitelio-mesenchimale.⁵⁷ Questa ipotesi è confermata dall'osservazione che, in molti casi, i pazienti con *carcinoma anaplastico*, presentano anche un carcinoma ben differenziato di origine *follicolare* ^{58,59}; ciò nonostante le *cellule follicolari mature* raramente proliferano, limitando così l'accumulo di mutazioni.⁶⁰ Inoltre, nel *carcinoma*

anaplastico, raramente si riscontrano le alterazioni genetiche trovate nei carcinomi differenziati, come i riarrangiamenti genici *RET/PTC* e *TRK*, le mutazioni dei geni in *BRAF* e *RAS*, presenti nel *carcinoma papillare* o il gene di fusione *PAX8/PPAR γ* associato al *follicolare*.⁶¹

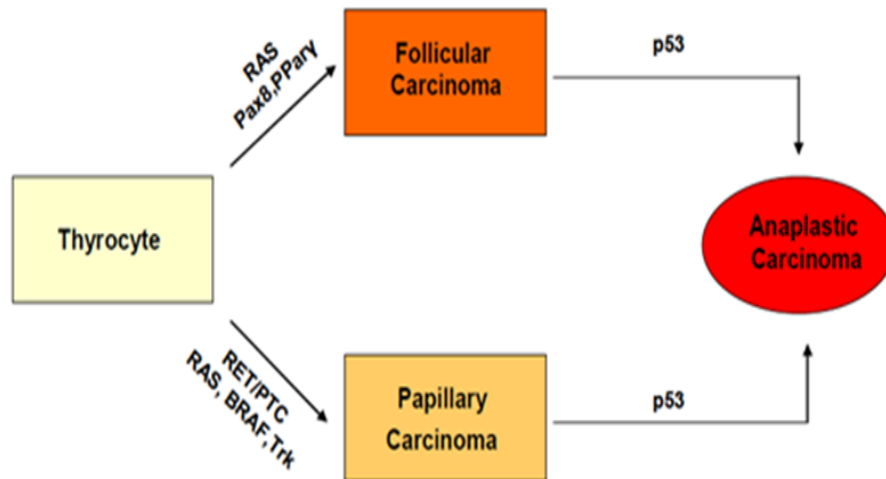


Figura 21. Modello di carcinogenesi multistep. (Catalano V. et al. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*. Springer, 2012).

Secondo il *modello di carcinogenesi delle cellule fetali* (Figura 22), le cellule tumorali tiroidee derivano da *cellule staminali normali* o *precursori cellulari* di origine fetale piuttosto che da cellule follicolari mature.

La tiroide di un adulto, infatti, presenta tre diversi tipi di cellule fetali tiroidee organizzate gerarchicamente e in grado di dar vita alle differenti forme di carcinoma:

- la *cellula staminale fetale tiroidea*, che esprime la *fibronectina oncofetale (OF)* ma non i marker caratteristici delle cellule tiroidee differenziate è in grado di dare origine al *carcinoma anaplastico*;
- il *tireoblasto*, che esprime sia la *fibronectina oncofetale*, sia il marker *tireoglobulina (Tg)*, dà origine al *carcinoma papillare*;
- il *protireocita*, che esprime la *tireoglobulina* ma non la *fibronectina oncofetale*, sviluppa il *carcinoma follicolare*.⁶²

Il fenotipo della cellula staminale tiroidea, però, non è stato ancora ben identificato.

Di recente è stato dimostrato che i fattori trascrizionali TTF1 (thyroid transcription factor 1), TTF2 (thyroid transcription factor 2) e PAX8 (paired box 8) vengono espressi all'inizio dello sviluppo della tiroide, quando la ghiandola inizia a formarsi dal pavimento della primitiva faringe. Durante lo sviluppo embrionale, le cellule iniziano ad esprimere il TSHR (thyroid stimulating hormone receptor), vengono indotte a differenziare e a esprimere marker tipici quali la Tg, TPO (tireoperossidasi) e il NIS (sodium iodine symporter).^{63,64}

Recentemente è stato scoperto che i carcinomi *papillare*, *follicolare* e *anaplastico* contengono una piccola popolazione di cellule tumorigeniche caratterizzate da un'elevata attività dell'ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1), che non si ritrova nel tessuto sano. Le cellule tiroidee che presentano un'elevata espressione di ALDH1, possiedono la capacità di autorinnovarsi e di dar vita, se inoculate in topi immunocompromessi, ad un tumore che riproduce le caratteristiche fenotipiche del tumore parentale.⁶⁵

La Tg e il TTF1 che sono stati ritrovati nel *carcinoma papillare* e nel *follicolare*, nel *carcinoma anaplastico*, invece sono espressi a bassi livelli o sono assenti.⁶⁶

La CK19 (citocheratina-19) viene espressa nel carcinoma *papillare* e nel *follicolare* ma viene lievemente rilevata in cellule che derivano dal carcinoma *anaplastico*.

CD44 (recettore per componenti della matrice extracellulare) è espresso sia dalle cellule sane sia dalle cellule tumorali tiroidee.⁶⁶

Cambiamenti genetici, che includono i riarrangiamenti *RET/PTC*, *PAX8/PPAR γ* e mutazioni genetiche dei geni *BRAF*, *RAS* e *TP53* impediscono alle cellule fetali tiroidee di differenziare conferendo loro un vantaggio proliferativo.

Diversi elementi sostengono il modello delle cellule fetali. L'incidente nucleare di Chernobyl ha prodotto il rilascio di enormi quantità di iodio radioattivo, determinando lo sviluppo del carcinoma *papillare* in neonati e bambini ma non negli adulti esposti all'incidente. Quest'osservazione suggerisce che il carcinoma *papillare* può derivare da *cellule fetali tiroidee* che rappresentano nei neonati e bambini, le cellule prevalenti o possibilmente più suscettibili agli effetti dello iodio radioattivo. Topi transgenici per *RET/PTC1*, che mancano di cellule follicolari normali, sviluppano il carcinoma *papillare* e ipotiroidismo congenito. Il transgene *RET/PTC1* causa ipotiroidismo congenito prevenendo la differenziazione delle *cellule fetali tiroidee* o potrebbe indurre le *cellule follicolari* a dedifferenziare.⁶⁷

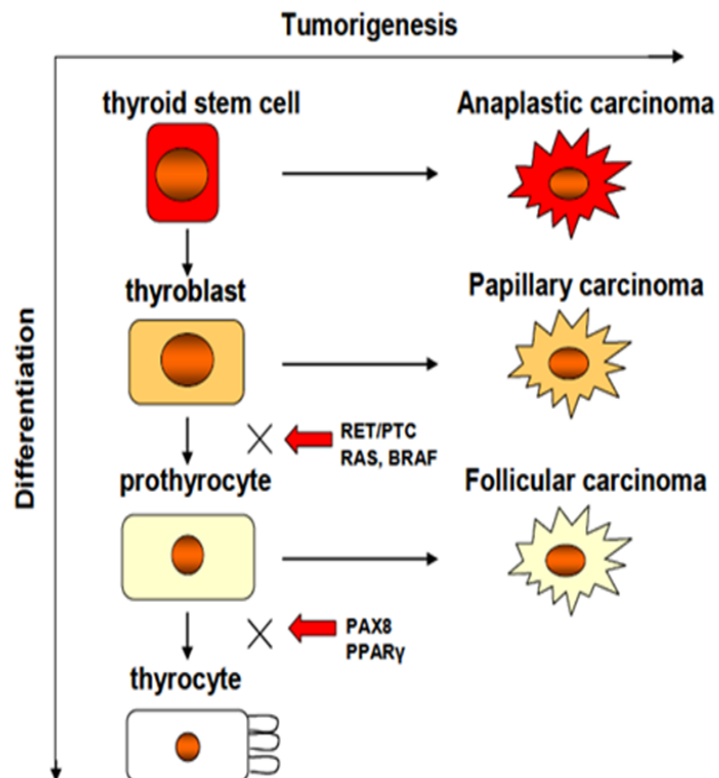


Figura 22. Modello di carcinogenesi delle cellule fetali. (Catalano V. et al. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*. Springer, 2012).

Non è chiaro se le cellule tumorali tiroidee derivano da cellule progenitrici adulte o da cellule tiroidee che hanno acquisito la capacità di autorinnovarsi o se sono il risultato di mutazioni epigenetiche che si sono verificate in cellule staminali normali.

SCOPO DELLA TESI

La presenza delle cellule staminali tumorali (CST), nella maggior parte dei tumori, sembra essere la causa del fallimento della chemioterapia convenzionale e della comparsa di recidive. Queste cellule sono state isolate da vari tumori, compresi i carcinomi tiroidei.

Per spiegare l'oncogenesi del carcinoma tiroideo negli ultimi anni sono stati formulati vari modelli. *Il modello di carcinogenesi delle cellule fetali tiroidee*, suggerisce che le cellule tumorali della tiroide possano derivare da precursori cellulari di origine fetale, piuttosto che da cellule follicolari mature presenti nel tessuto tiroideo. La tiroide di un adulto, infatti, presenta tre diversi tipi di cellule fetali tiroidee organizzate gerarchicamente e secondo tale modello in grado di dar vita alle differenti forme di carcinoma: la *cellula staminale fetale tiroidea* che potrebbe dare origine al *carcinoma anaplastico* della tiroide; il *tireoblasto* che svilupperebbe il carcinoma *papillare* ed infine il *protireocita* probabile precursore del carcinoma *follicolare*.

L'alterazione più frequente presente nel carcinoma tiroideo è l'attivazione costitutiva della via di segnalazione di Ras che determina proliferazione incontrollata e che previene il differenziamento delle cellule fetali tiroidee con la formazione di tumori tiroidei.

Nello specifico, infatti, il *modello di carcinogenesi delle cellule fetali tiroidee* sostiene che i riarrangiamenti *RET/PTC1* e *PAX8/PPAR γ* e le mutazioni puntiformi dei geni *BRAF*, *RAS* e *TP53* prevengono il differenziamento delle cellule fetali tiroidee conferendo alle stesse un vantaggio proliferativo.

L'obiettivo dello studio è capire se il riarrangiamento genico *RET/PTC* e le mutazioni dei geni *BRAF*^{V600E}, *NRAS*^{Q61K} e *TP53*^{R273H} sono in grado di guidare la trasformazione di cellule staminali normali in cellule inizianti i carcinomi tiroidei.

A tal scopo, sono state isolate le cellule staminali e differenziate da tessuto tiroideo.

Gli oncogeni sopracitati sono stati clonati in un vettore lentivirale e, dopo aver settato le migliori condizioni per ottenere un buon titolo virale, i virioni sono stati adoperati per trasdurre le cellule isolate staminali e quelle differenziate.

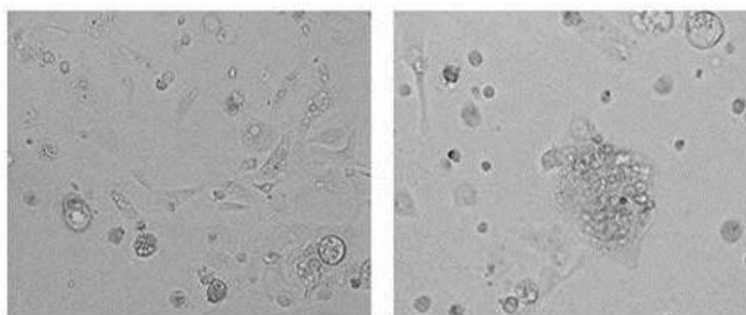
Dal momento che le cellule differenziate poco tempo dopo l'isolamento andavano incontro a morte nonostante la trasduzione con i vettori lentivirali, gli effetti dell'espressione degli oncogeni è stata valutata solo nelle cellule staminali tiroidee. Per valutare la loro capacità clonogenica ed invasiva sono stati condotti saggi *in vitro* e per

testare la loro tumorigenicità sono stati eseguiti saggi *in vivo* mediante inoculo sottocutane in modelli murini immunocompromessi.

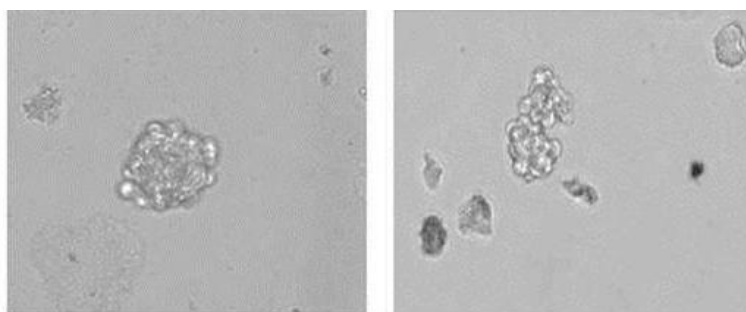
RISULTATI

Isolamento di cellule da frammenti di tessuto tiroideo

Il tessuto normale tiroideo è stato ottenuto da biopsie di pazienti affetti da gozzo, dopo firma del consenso informato, grazie alla collaborazione con il dott. Lorenzo Memeo dello Istituto Oncologico Mediterraneo, IOM, di Catania. La diagnosi è stata basata su criteri clinici e test di laboratorio appropriati (analisi dei livelli ematici di TSH, fT3, fT4) e successivamente confermata da esami istologici. Inoltre analisi mutazionali hanno escluso la presenza di mutazioni normalmente associate alla carcinogenesi tiroidea. Il pezzo tissutale è stato sottoposto ad una digestione meccanica ed enzimatica mediante collagenasi e ialuronidasi, descritto nei metodi. Le cellule così isolate sono state poste in coltura sia *in condizioni di aderenza* in presenza di terreno DMEM con l'aggiunta del 10% di FBS, al fine di ottenere colture primarie, sia *in condizioni di non aderenza* in STEM medium in presenza di bFGF ed EGF, per ottenere cellule staminali; in queste condizioni le cellule selezionate crescono in sospensione formando piccole sfere (tireosfere) (Figura 23).



Linea cellulare primaria in DMEM e 10% FBS



Tireosfere in STEM medium con bFGF e EGF

Figura 23. Linea cellulare primaria in DMEM e 10%FBS e cellule staminali (tireosfere) in STEM medium con bFGF e EGF, entrambe provenienti da tessuto tiroideo.

Successivamente all'isolamento delle cellule staminali normali, si è proceduto alla validazione dell'ipotesi secondo cui mutazioni geniche e riarrangiamenti cromosomici a carico di alcuni oncogeni possano determinare la trasformazione di cellule staminali normali e di cellule differenziate, i tireociti, in cellule staminali tumorali.

Preparazione dei vettori lentivirali contenenti gli oncogeni

Per ottenere l'espressione degli oncogeni P53^{R273H}, RET/PTC1, NRAS^{Q61K} e BRAF^{V600E} nelle cellule staminali isolate si è scelto di utilizzare un vettore lentivirale dal momento che tali cellule proliferano lentamente. A tal fine il cDNA degli oncogeni P53^{R273H}, RET/PTC1, NRAS^{Q61K} e BRAF^{V600E} è stato amplificato e clonato all'interno del sito di multiclonaggio del vettore pLenti-CMV-RFP-2A-Puro (Figura 24), che contiene i geni e per la proteina fluorescente rossa (RFP) e per la resistenza all'antibiotico puromicina.

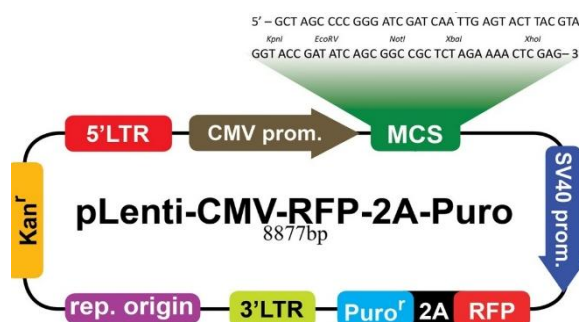


Figura 24. Mappa del vettore lentivirale pLenti-CMV-RFP-2A-Puro

I vettori ricombinanti ottenuti sono stati trasfettati in cellule HEK293T assieme ai plasmidi PSPAX2 e pMD2.G che forniscono in trans le proteine necessarie per la produzione dei virioni. Sebbene siano stati selezionati vari agenti di trasfezione e cercate le migliori condizioni, descritte in dettaglio nei metodi, il titolo virale non è mai stato elevato. Gli esperimenti di trasduzione con i virioni così preparati, nelle tireosfere dissociate in cellule, non hanno dato i risultati attesi. Infatti è stato evidenziato che all'aumentare della lunghezza del cDNA clonato nel vettore virale, l'efficienza di trasduzione si abbassava drasticamente (Figura 25). Inoltre le cellule mostravano una spiccata sensibilità alla puromicina adoperata per la selezione. Per tali ragioni la trasduzione non è stata efficiente per tutti gli oncogeni.

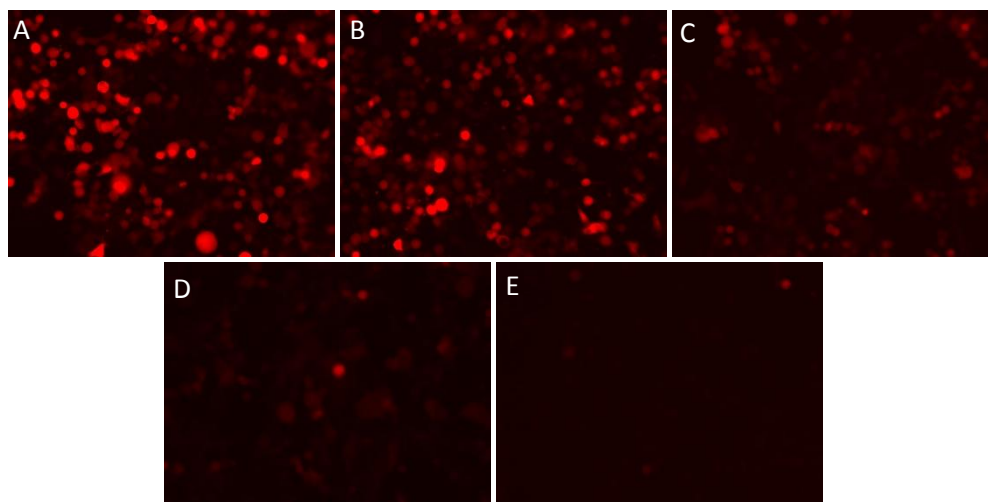


Figura 25. Tirosofere trasdotte, in ordine, con i vettori *pLenti* (A) , *pLentiNrasQ61K*(B), *pLenti53R273H* (C), *pLenti BrafV600E* (D) e *pLentiRET/PTC1* (E).

Per ovviare a tali inconvenienti si è deciso di cambiare vettore e di utilizzare il vettore lentivirale pTween-EGFP schematizzato in Figura 26 e descritto nei metodi. Questo vettore contiene come gene reporter il gene *EGFP* che codifica per la proteina fluorescente verde.

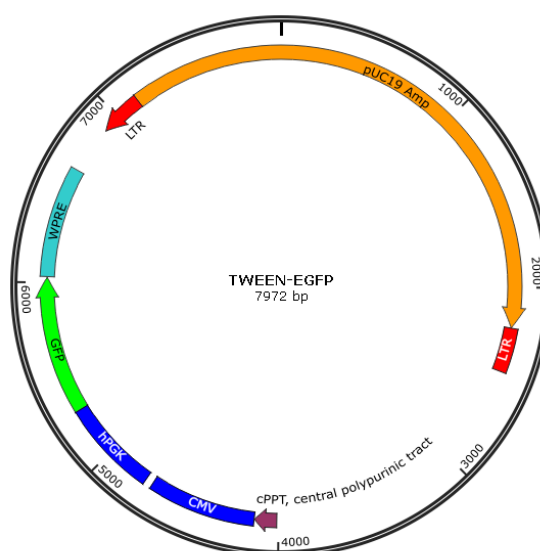


Figura 26. Mappa del vettore lentivirale *pTweenEGFP*.

Dall'analisi della sequenza del vettore si è evidenziato che i siti di restrizione utili per il clonaggio non erano compatibili con gli oncogeni P53^{R273H}, RET/PTC1, NRAS^{Q61K} e BRAF^{V600E}. E' stato necessario, quindi, inserire un sito di multiclonaggio per consentire il clonaggio di tali geni. L'inserzione di tale sequenza avrebbe potuto generare instabilità o fenomeni di ricombinazione, pertanto il vettore modificato pTweenEGFPMCS è stato trasfettato nelle cellule HEK293T, assieme ai plasmidi PSPAX2 e pMD2.G, per saggiare la sua capacità di produrre virioni.

A tal scopo sono state adoperate diverse condizioni di trasfezione, modificando la quantità di agente trasfettante (in ascissa nella Figura 27A) e la quantità di DNA (in ordinata nella Figura 27A). La condizione scelta per la produzione di virioni è stata quella che determinava la maggior fluorescenza (saggiata mediante citofluorimetria) con la minore quantità di DNA e agente trasfettante. I virioni così prodotti sono stati poi testati per la loro efficienza nelle stesse cellule HEK293T. Come mostrato in Figura 27B, la trasduzione è avvenuta con successo.

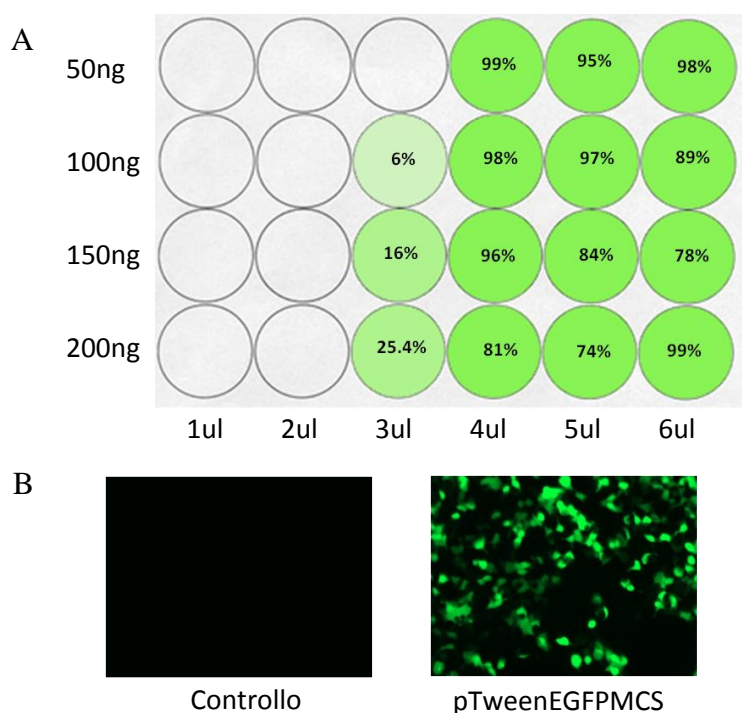


Figura 27. A) Schema delle prove per l'ottimizzazione delle condizioni di trasfezione del plasmide pTweenEGFPMCS in cellule HEK293T. B) Trasduzione delle cellule HEK293T con i virioni ottenuti con il vettore pTweenEGFPMCS dopo la fase di ottimizzazione del titolo virale e cellule controllo non trasdotte.

Si è proceduto alla preparazione dei virioni contenenti il cDNA degli oncogeni. Gli oncogeni P53^{R273H}, RET/PTC1, NRAS^{Q61K} e BRAF^{V600E} sono stati clonati nel vettore modificato, come descritto nei materiali e metodi. Quindi sono state ricercate, anche in questo caso, le migliori condizioni di trasfezione nelle cellule HEK293T per avere un buon titolo virale.

Trasduzione delle tireosfere e delle cellule differenziate con i virioni ottenuti dai vettori lentivirali contenenti gli oncogeni

Successivamente alla preparazione dei virioni per l'espressione dei sopradetti oncogeni nelle tireosfere, abbiamo proceduto alla loro trasduzione. Come è mostrato nella Figura 28, la trasduzione con i vettori contenenti gli oncogeni è avvenuta in maniera efficiente in quanto tutte le cellule delle tireosfere hanno espresso il gene reporter GFP.

La trasduzione con i vettori contenenti gli oncogeni è stata effettuata anche nelle cellule differenziate in adesione (Figura 23). Tuttavia in questo caso le cellule sia trasdotte che non trasdotte sono morte dopo circa due settimane. Pertanto gli esperimenti sono stati condotti solo con le tireosfere.

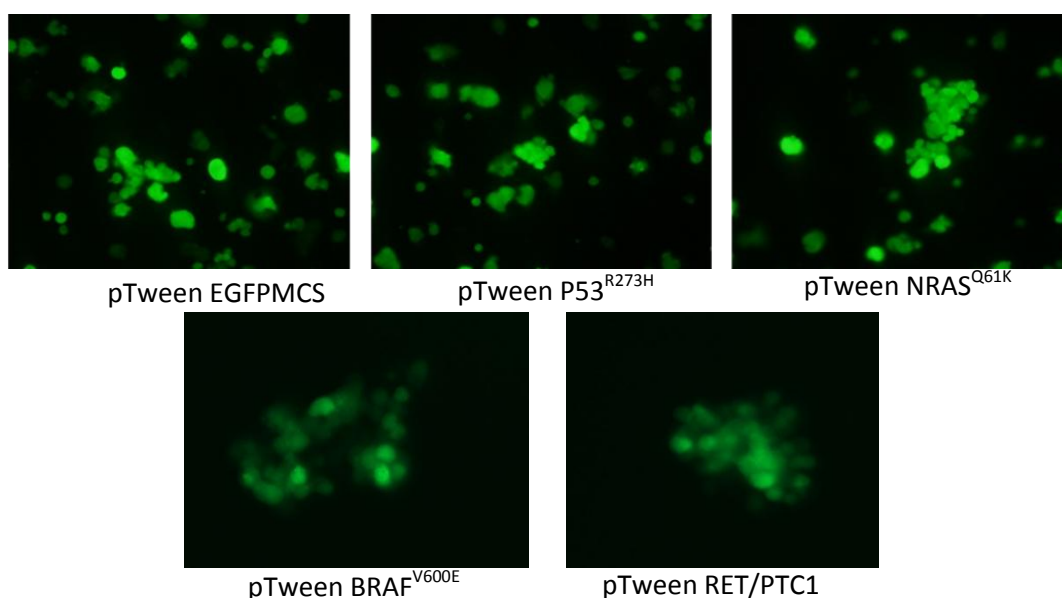


Figura 28. Tireosfere trasdotte con i virioni ottenuti dai vettori lentivirali pTween EGFP MCS, pTweenP53R273H, pTweenNrasQ61K, pTweenBrafV600E e pTweenRET/PTC1 osservate dopo 21 dalla trasduzione.

Le tireosfere, trasdotte sono state adoperate in saggi *in vitro* per valutare gli effetti dei suddetti oncogeni sulla loro capacità clonogenica ed invasiva.

Saggi in vitro di clonogenesi delle tireosfere trasdotte.

Il potenziale clonogenico è stato valutato ponendo in coltura le cellule trasdotte in piastre “96 multiwell” in modo da ritrovare una singola cellula per pozzetto. Monitorando la crescita nei giorni successivi, sono stati considerati i pozzetti in cui le singole cellule sono riuscite a creare dei piccoli cloni cellulari rispetto al totale dei pozzetti inizialmente a singola cellula.

Le cellule trasdotte con i virioni ottenuti dai vettori lentivirali contenenti gli oncogeni hanno mostrato una maggiore capacità clonogenica rispetto alle cellule controllo trasdotte solo con il vettore lentivirale pTweenEGFPMCS (Figura 29). I risultati, inoltre, hanno anche mostrato che i vettori pTweenNras^{Q61K} e pTweenBraf^{V600E} hanno conferito alle cellule una maggiore capacità clonogenica rispetto alle cellule esprimenti gli altri oncogeni.

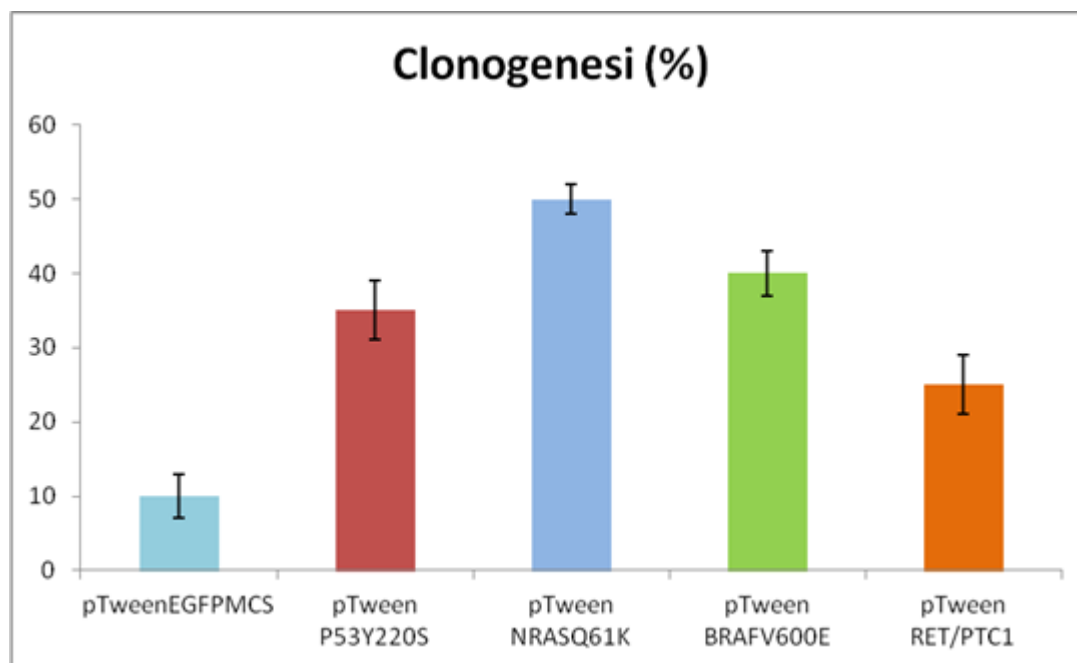


Figura 29. Percentuale delle cellule clonogeniche trasdotte con i vettori lentivirali pTweenEGFPMCS, pTweenp53R273H, pTweenNrasQ61K, pTweenBrafV600E e pTweenRET/PTC1.

Saggi in vitro di invasione delle tireosfere trasdotte

La capacità invasiva è stata valutata mediante piastre transwell, in cui i singoli pozzetti sono costituiti da due camere separate da una membrana di policarbonato di diametro noto. Nella camera inferiore è stato posto un medium condizionato da cellule NIH 3T3 come chemioattrattante e nella camera superiore un sottile strato di matrigel per simulare la matrice extracellulare e sopra di esso sono state pilastrate le cellule trasdotte. Il rapporto tra il numero di cellule che dopo 24 ore sono riuscite a migrare nella camera inferiore e il numero di cellule totali inizialmente poste nella camera superiore ci ha dato una indicazione sul potenziale invasivo di tali cellule. Le tireosfere trasdotte con gli oncogeni posseggono una spiccata capacità invasiva rispetto al controllo trasdotto solo con il vettore lentivirale pTweenEGFPMCS come mostrato in Figura 30.

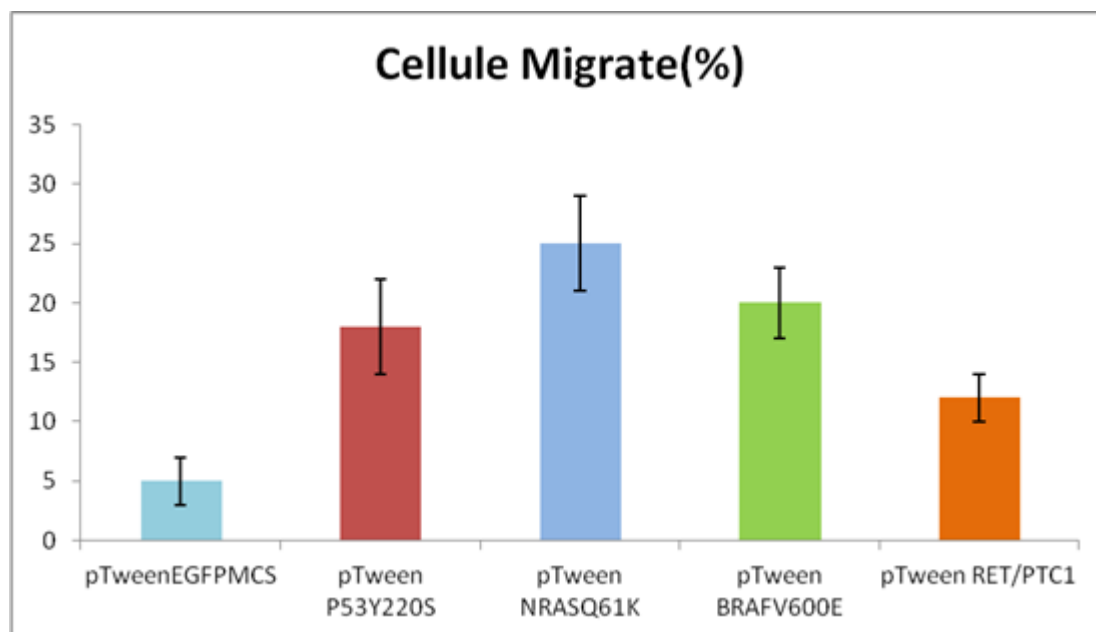


Figura 30. Percentuale delle cellule migrate dopo la trasduzione con i vettori lentivirali *pTween EGFP*MCS, *pTweenp53R273H*, *pTweenNrasQ61K*, *pTweenBrafV600E* e *pTweenRET/PTC1*.

I risultati dei saggi in vitro hanno evidenziato che l'espressione degli oncogeni nelle tireosfere ha modificato la loro fisiologia aumentando notevolmente la loro clonogenicità e anche la loro capacità invasiva.

Per valutare se le nuove capacità acquisite dalle tireosfere trasdotte, siano associate ad una trasformazione maligna abbiamo effettuato un saggio in vivo in modelli murini immunocompromessi.

Saggi in vivo: tumorigenicità delle tireosfere trasdotte con gli oncogeni.

E' stata valutata, quindi, la capacità tumorigenica delle tireosfere trasdotte con i vettori *pTween EGFP*, *pTweenp53^{R273H}*, *pTweenNras^{Q61K}*, *pTweenBraf^{V600E}* e *pTweenRET/PTC1*, mediante inculo sottocute in topi NOD/SCID $Il2r\gamma^{-/-}$ (NSG). Tali modelli murini sono geneticamente modificati e risultano immunocompromessi sia a livello dell'immunità acquisita sia a livello dell'immunità innata. La ridotta risposta immunitaria consentirà l'eventuale crescita di una massa tumorale se le cellule inoculate

posseggono un potenziale tumorigenico. Come mostrato in Figura 31, le cellule trasdotte con i vettori contenenti gli oncogeni hanno determinato, dopo circa 4 settimane, la formazione di una massa tumorale, il cui volume è stato calcolato come descritto nei metodi. Al contrario le cellule controllo, trasdotte con il vettore pTween EGFPMCS, non hanno mostrato nessuna capacità tumorigenica. Inoltre abbiamo constatato che le cellule trasdotte con i virioni ottenuti dai vettori pTweenp53^{R273H} e pTweenNras^{Q61K} hanno indotto la formazione delle masse tumorali più grandi.

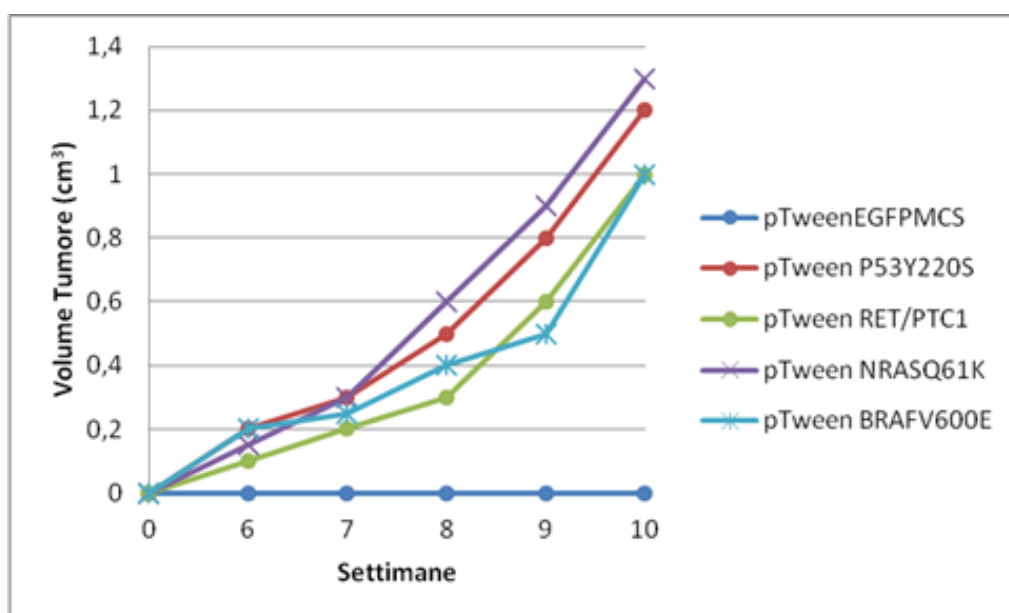


Figure 31. Volume degli xenograft ottenuti da inoculo ortotopico delle cellule trasdotte con i vettori pTween EGFPMCS, pTweenp53^{R273H}, pTweenNras^{Q61K}, pTweenBraf^{V600E} e pTweenRET/PTC1.

DISCUSSIONE

Recenti scoperte hanno dimostrato che le cellule in grado di iniziare e mantenere un tumore possiedono le proprietà caratteristiche delle cellule staminali; da qui il nome cellule staminali tumorali (*CST*).

La presenza delle *CST* nella maggior parte dei tumori sembra essere la causa del fallimento della chemioterapia convenzionale e della comparsa di recidive. Per questa ragione, la ricerca scientifica si propone di identificare e isolare le *CST*, al fine di conoscere le alterazioni genetiche che portano allo sviluppo del tumore e della chemio resistenza. Tali studi permetteranno di sviluppare terapie farmacologiche mirate e innovative.

Sono state formulate varie ipotesi riguardanti l'origine delle cellule tumorali tiroidee.

Il *modello di carcinogenesi multistep* afferma che i carcinomi tiroidei originano dal tireocita maturo in seguito all'accumulo di mutazioni genetiche multiple.⁷⁰ Ciononostante, l'esistenza di differenti carcinomi tiroidei con diversi gradi di differenziazione ha portato all'assunzione che le cellule staminali, organizzate gerarchicamente nella tiroide di un adulto, potessero essere responsabili dell'inizio e della progressione tumorale.

In particolare, il *modello di carcinogenesi delle cellule fetali* mostra che le cellule tumorali tiroidee derivano da *cellule staminali normali* in grado di dare origine alle differenti forme di carcinoma tiroideo in seguito a specifiche trasformazioni neoplastiche. Inoltre tale modello sostiene che i riarrangiamenti *RET/PTC1* e *PAX8/PPAR γ* e le mutazioni puntiformi dei geni *BRAF*, *RAS* e *TP53* possano prevenire il differenziamento delle cellule staminali tiroidee, conferendo quindi, alle stesse un vantaggio proliferativo.⁶²

Alcuni marker come CD44 e ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) vengono utilizzati per identificare lo stato indifferenziato delle cellule staminali.

E' stato dimostrato da *Todaro et al*⁶⁵ che i carcinomi *papillare*, *follicolare* e *anaplastico* contengono due tipologie di cellule. Una piccola popolazione di cellule tumorigeniche caratterizzate da un'elevata attività dell'ALDH1 e una popolazione di cellule differenziate caratterizzate da una bassa attività dell'ALDH1. Solo le prime hanno mostrato capacità di autorinnovarsi e di dare origine, se inoculate in topi immunocompromessi, a xenotumori con le caratteristiche fenotipiche del parentale.

Nel presente studio sono state isolate con successo cellule staminali e cellule differenziate tiroidee. Sebbene siano state settate le migliori condizioni per il mantenimento in coltura sia delle cellule staminali tiroidee che le cellule differenziate, è stato riscontrato che queste ultime andavano incontro a differenziamento terminale e morivano dopo poche settimane dall'isolamento. La maggior parte degli esperimenti sono stati effettuati solo con le cellule staminali tiroidee (tiresfere).

Per verificare se l'ipotesi che i carcinomi tiroidei derivino da cellule di tipo staminale che hanno acquisito alterazioni geniche, si è indotta l'espressione in tali cellule dei più comuni oncogeni associati ai carcinomi tiroidei, mediante l'utilizzo di vettori lentivirali. Una prima parte di tale studio è stata dedicata alla preparazione e validazione di tali vettori.

A questo scopo gli oncogeni *RET/PTC1*, *BRAF*^{V600E}, *NRAS*^{Q61K} e *P53*^{R175H} sono stati clonati inizialmente in un vettore lentivirale contenente due geni reporter (il gene per la proteina fluorescente rossa e il gene per la resistenza alla puomicina) la cui efficacia è stata inficiata dalla lunghezza dei geni clonati.

Pertanto dopo tanti tentativi è stato adoperato un altro vettore lentivirale, contenente soltanto il gene reporter *EGFP*. Tale vettore è stato opportunamente modificato per consentire il clonaggio dei suddetti oncogeni. Con questo vettore i problemi riscontrati in precedenza sono stati eliminati. Sono state ricercate e ottenute le migliori condizioni per ottenere un buon titolo virale. Successivamente si è proceduto alla trasduzione dei virioni nelle cellule staminali tiroidee. Lo stesso procedimento non ha dato buon risultato con le cellule differenziate, in quanto queste nonostante l'espressione degli oncogeni andavano incontro a differenziamento terminale e quindi a morte dopo poco tempo dalla trasduzione.

Per verificare che nelle cellule staminali tiroidee l'espressione degli oncogeni, *RET/PTC1*, *BRAF*^{V600E}, *NRAS*^{Q61K} e *P53*^{R175H}, cambi la loro fisiologia sono stati condotti saggi *in vitro* e *in vivo*.

I parametri investigati sono stati la capacità clonogenica ed la capacità invasiva.

I risultati hanno dimostrato chiaramente che le cellule staminali esprimenti gli oncogeni hanno una alta capacità clonogenica rispetto alle cellule controllo. In particolare la presenza del riarrangiamento genico *RET/PTC1* è associata ad una minore capacità clonogenica rispetto alla presenza della mutazione del gene *BRAF*^{V600E}, della mutazione

puntiforme del gene $TP53^{R273H}$ e anche del gene $NRAS^{Q61K}$. Questi dati sono in accordo con l'ipotesi formulata in questo studio.

Inoltre i risultati del saggio in vitro di invasione hanno evidenziato che in seguito all'espressione degli oncogeni $RET/PTC1$, $BRAF^{V600E}$, $NRAS^{Q61K}$ e $P53^{R273H}$, le cellule staminali tiroidee acquisiscono una alta capacità migratoria.

Infine per valutare se le cellule trasdotte con gli oncogeni abbiano acquisito un fenotipo tumorale sono stati condotti dei saggi in vivo con inoculo sottocute in modelli murini immunocompromessi.

I risultati *in vivo* hanno dimostrato, infine, che le cellule staminali tiroidee trasdotte con gli oncogeni se inoculate in topi NOD/SCID danno origine ad una massa tumorale il cui volume è stato monitorato nel tempo.

Tali dati preliminari forniti da questo studio possono aiutare nella comprensione dell'origine dei carcinomi tiroidei. E' stato infatti mostrato che le alterazioni geniche a carico dei geni esaminati possono avere un ruolo nella tumorigenesi nelle cellule staminali tiroidee. I dati mostrano che lo stesso effetto non si riscontri nelle cellule differenziate. Probabilmente il loro stato differenziato non consente un cambiamento in senso neoplastico, infatti invecchiano e muoiono. Questi dati nel loro insieme consentono di sostenere l'ipotesi del *modello di carcinogenesi delle cellule fetali*

Ulteriori studi sulle vie di segnalazione alterate dall'espressione degli oncogeni potranno consentire una migliore comprensione del processo che ha portato alla trasformazione di tali cellule staminali normali in cellule staminali tumorali, nonché la possibilità di ipotizzare lo sviluppo di terapie nuove e alternative.

MATERIALI E METODI

Clonaggio di *RET/PTC1*, *NRAS*^{Q61K}, *BRAF*^{V600E}, *P53*^{R273H} in vettori lentivirali di seconda generazione

Plasmidi utilizzati

p-Lenti-CMV-RFP-2A-PURO self-inactivating (ABM inc.):

Plasmide contenente il vettore di trasferimento lentivirale e la parte plasmidica di origine batterica.

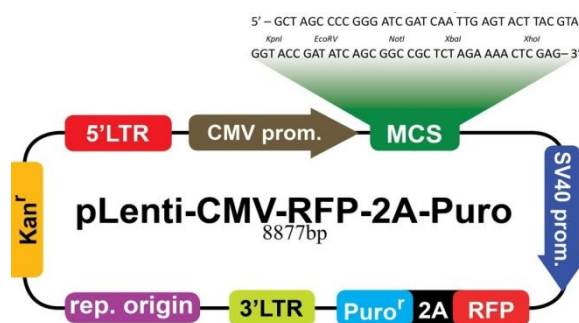
Parte plasmidica di origine batterica (Figura 24):

- Origine di replicazione per *E. Coli*
- Gene di resistenza alla kanamicina

Vettore lentivirale di trasferimento:

- Promotore derivante dal virus SV40 per l'espressione della proteina reporter RFP e l'espressione del gene per la resistenza alla puromicina
- Promotore derivante dal CMV deputato all'espressione del gene di interesse
- LTR (Long Terminal Repeat). Questo vettore è wild-type per il 5' LTR (con la regione *Tata box*) ma con la 3'-LTR mutata al fine di renderlo un vettore "self inactivating" (SIN vector) per delezione dell'enhancer virale della regione U3.

Il vettore richiede la proteina Tat per l'attivazione trascrizionale.



pTweenEGFP:

Vettore lentivirale, gentilmente fornito mediante collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità. Parte plasmidica di origine batterica (Figura 24):

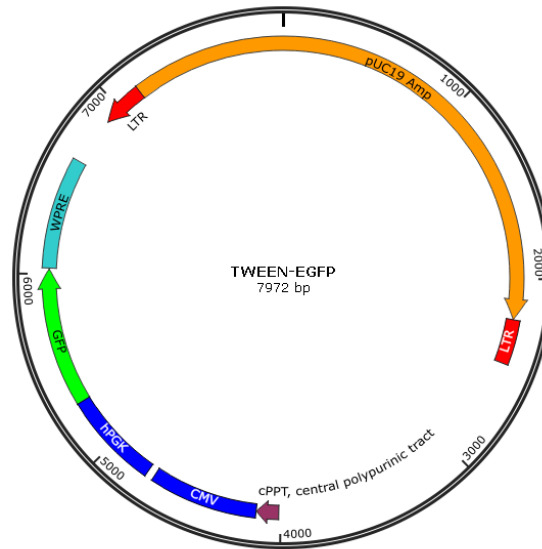
- Origine di replicazione per *E. Coli*
- Gene di resistenza alla ampicillina

Vettore lentivirale di trasferimento:

- Promotore derivante dal gene fosfogliceratochinasi PGK per l'espressione del gene reporter GFP.
- Promotore derivante dal CMV deputato all'espressione del gene di interesse

- LTR (Long Terminal Repeat). Questo vettore è wild-type per il 5' LTR (con la regione *Tata box*) ma con la 3'-LTR mutata al fine di renderlo un vettore “self inactivating” (SIN vector) per delezione dell'enhancer virale della regione U3.

Il vettore richiede la proteina Tat per l'attivazione trascrizionale.



psPAX2 (Addgene):

Vettore di *packaging* per la produzione di vettori ricombinanti nella linea cellulare HEK293T (Figura 25) che contiene:

- *Gag*, codificante le proteine della matrice, capside e nucleocapside
- *Pol* codificante la proteasi, trascrittasi inversa e integrasi
- Le sequenze geniche *Tat* e *Rev* la cui espressione è guidata dal promotore del CMV.

Inoltre è presente la sequenza per l'esporto nucleare dei trascritti.

pMD2G (AddGene):

Vettore *envelope* codificante per glicoproteina di membrana VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein), sotto il controllo del promotore CMV che consente l'infezione di qualsiasi tipo cellulare.

Reazione di PCR

I diversi cDNA codificanti per *RET*/PTC1, *NRAS*^{Q61K}, *BRAF*^{V600E}, *P53*^{R273H}, amplificati tramite PCR, sono stati clonati nel vettore pLenti-CMV-RFP-2A-PURO.

Per la reazione di PCR (35-40 cicli di amplificazione) sono stati utilizzati 5ng/μl di DNA plasmidico, primers alla concentrazione di 10mM, Master mix 2X Invitrogen (contenente la Taq polimerasi hot start, buffer di reazione, dNTPs e MgCl₂) in un volume finale di 30μl.

Profilo di amplificazione:

95°C 5'	}	x 35 cicli
95°C 45"		
60°C 45"		
72°C 1'		
72°C 10'		

Primer utilizzati:**RET/PTC1**

Nhe/NotF 5'-GCTAGCATGGCGGACAGCGCCAGCGA-3'

Nhe/NotR 5'-GCGGCCGCCTAGAATCTAGTAAATGCATGG -3'

NRAS^{Q61K}

Nhe/NotF 5'-AAAAGCTAGCATGACTGAGTACAAACTG-3'

Nhe/NotR 5'-AAAAGCGGCCGCTTACATCACCACACATGGCA-3'

BRAF^{V600E}

Nhe/NotF 5'-GCTAGCATGGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTG-3'

Nhe/NotR 5'-GCGGCCGCTCAGTGGACAGGAAACGCAC -3'

P53^{R273H}

Nhe/NotF 5'-GCTAGCATGGAGGAGCCGCAGTCAGA-3'

Nhe/NotR 5'- GCGGCCGCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3'

I prodotti di PCR sono stati successivamente purificati con il kit “MiniElute PCR purification kit” (Qiagen) seguendo le indicazioni della casa produttrice.

Digestione di vettori plasmidici

I frammenti genici purificati, sono stati digeriti con *NheI* (BioLabs Inc.) e *NotI* (BioLabs Inc.) e inseriti nel vettore pLenti-CMV-RFP-2A-PURO digerito con gli stessi enzimi di restrizione. Le reazioni di digestione sono state effettuate utilizzando 2µg di vettore plasmidico, buffer di reazione 10X specifico per l'enzima, BSA 10X, enzima 1U/µl per µg di DNA plasmidico, in un volume finale di reazione di 40µl ed incubate per 2h a 37°C.

Reazione di ligasi

È stato usato un rapporto molare plasmide/inserito di 1:3. Per ogni reazione di ligasi, sono stati utilizzati 20ng di vettore plasmidico posto a reagire con:

- 16ng di inserto *BRAF*^{V600E}
- 6ng di inserto *NRAS*^{Q61K}
- 10ng di inserto *RET/PTC1*
- 8ng di inserto *P53*^{R273H}

buffer ligasi 10X, T4 DNA ligase 1U/µl in un volume finale di 20µl. Le reazioni sono state incubate per 1h a 37°C.

Trasformazione batteri competenti con il DNA plasmidico

Le cellule batteriche competenti (One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R, Invitrogen) sono state incubate con il DNA da trasformare (40-100ng) per 30 minuti in ghiaccio, per 30 secondi a 42°C e di nuovo in ghiaccio per 2 minuti. A seguito dello shock termico, alla sospensione cellulare sono stati aggiunti 250µl di SOC medium. La sospensione è stata messa in agitazione a 37°C per 1h in modo da favorire almeno due cicli di replicazione. In seguito, le cellule sono state seminate su piastre selettive di LB agar ed incubate o.n. a 37°C.

Purificazione DNA plasmidico

Le colonie formatesi sulla piastra vengono incubate in brodo LB contenente lo stesso antibiotico utilizzato per la preparazione delle piastre. Il giorno seguente viene effettuata l'estrazione del DNA plasmidico mediante i kit di estrazione Wizard SV MidiPreps e Wizard SV MaxiPreps (Promega) seguendo le indicazioni della casa produttrice.

La stima della purezza e della concentrazione della preparazione plasmidica è stata valutata mediante lettura al NanoDrop.

Analisi dei plasmidi ricombinanti

La presenza o l'assenza del frammento di interesse è stata verificata tramite PCR seguita da elettroforesi su gel di agarosio. Per verificare lo stato mutazionale dei diversi geni clonati, i campioni sono stati spediti in Germania presso l'Eurofins MWG per essere sequenziali.

Trasfezione transiente delle cellule HEK-293T per la produzione di virioni lentivirali di seconda generazione.

Linea cellulare HEK-293T

Le HEK-293T sono cellule embrionali di rene umano a morfologia stellata, coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Euroclone) addizionato con 10%FBS, glutamina ed in assenza di antibiotici. Le cellule sono state mantenute in coltura ad una temperatura di 37°C e in atmosfera con il 5% di CO₂.

Trasfezione

24h prima della trasfezione si piastrano circa 5×10^5 cellule in una fiaschetta non-ultra low attachment (Corning) da 25 cm² con 10ml di terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Euroclone) addizionato con 10%FBS. Si utilizzano cellule a basso numero di passaggi (P8-P9).

La trasfezione è stata eseguita secondo il protocollo X-tremeGENE HP DNA transfection Reagent (Roche). Questo reagente è basato su liposomi. I liposomi sono un misto di lipidi policationici e neutri, che permette la formazione di vescicole liposomiali

unilamellari recanti una carica netta positiva. La testa cationica del composto lipidico si associa ai gruppi fosfato negativi dell'acido nucleico e media al tempo stesso l'interazione e fusione con la membrana plasmatica della cellula, riversando il complesso lipidi-DNA al suo interno.

Rapporto tra plasmidi:

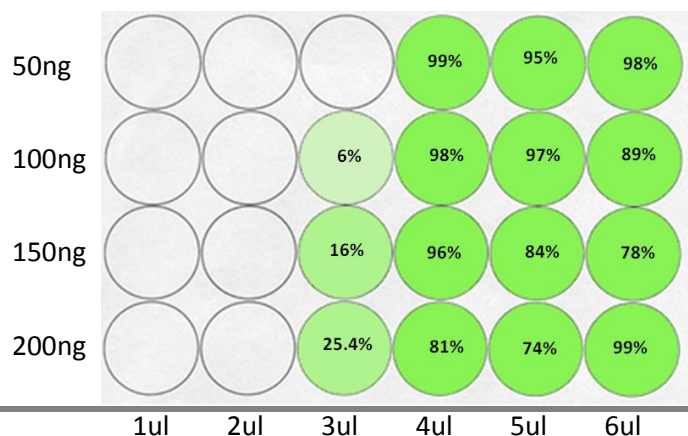
Vettore	4µg
psPAX2	2.6µg
pMD2G	1.4µg

La miscela dei plasmidi (DNA plasmidico totale 8µg) è diluita in 600µl di terreno DMEM + 10% FBS, a cui viene aggiunto il reagente di trasfezione in un rapporto di 4:1 rispetto al DNA totale. La reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. Dopo l'incubazione, la soluzione ottenuta è stata fatta gocciolare all'interno della fiaschetta.

Dopo 72h dalla trasfezione si è proceduto alla raccolta e alla filtrazione dei virioni. La sospensione virale è stata aliquotata in criotubi e conservata a -80°C.

Ottimizzazione delle condizioni di trasfezione

Al fine di ottimizzare le condizioni di trasfezione per ottimizzare il titolo virale 40000 cellule HEK293T sono state seminate in ciascun pozzetto di una piastra multiwell da 24 pozzetti. In tubi di polipropilene è stata preparata la miscela dei plasmidi per la preparazione dei virioni con quantità crescenti di agente trasfettante. In ciascun pozzetto delle cellule precedentemente seminate è stata aggiunta una quantità crescente di DNA complessato, il risultato sarà dato orizzontalmente da quantità crescenti di agente trasfettante e verticalmente da quantità crescenti di DNA. L'efficienza è stata valutata mediante citofluorimetria.

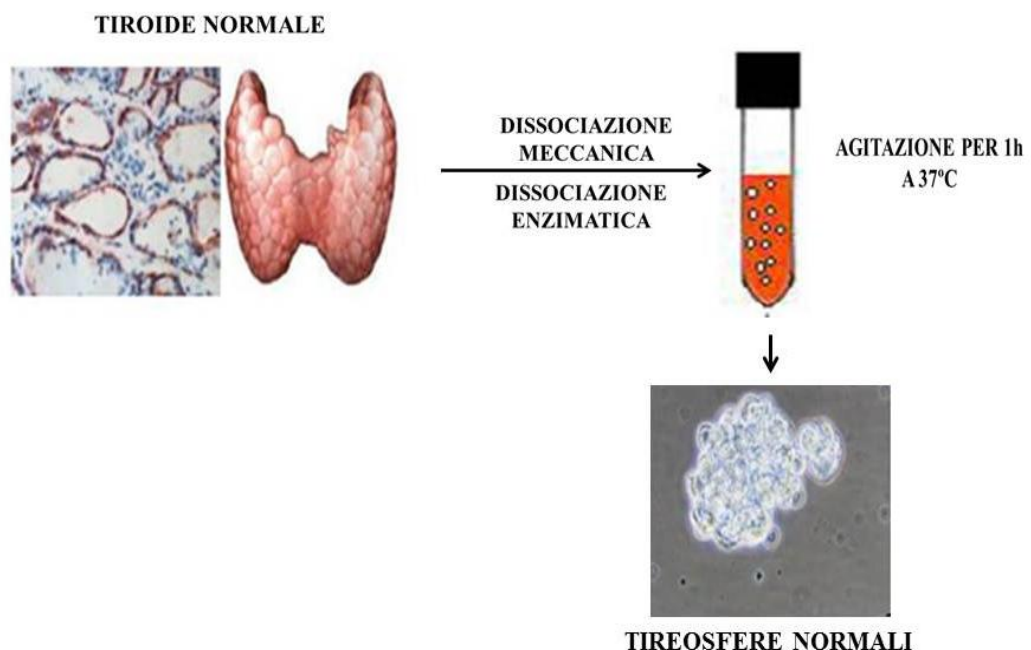


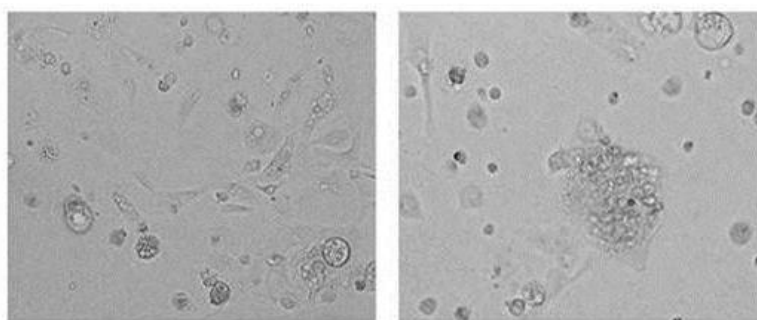
Isolamento di cellule da frammenti di tessuto

Il tessuto normale tiroideo è stato ottenuto da biopsia di pazienti affetti da gozzo, dopo firma del consenso informato. La diagnosi è stata basata su criteri clinici e test di laboratorio appropriati (TSH, fT3, fT4) e successivamente confermata da esami istologici.

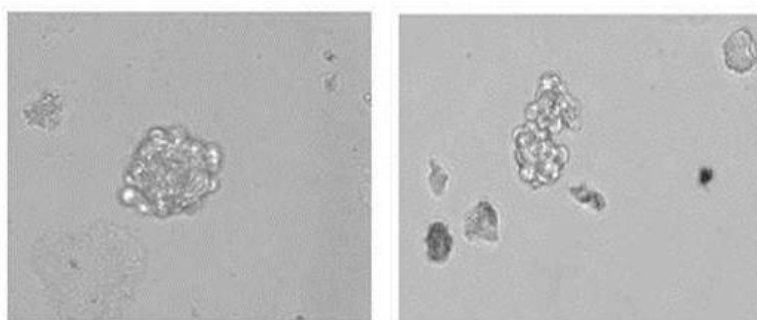
Dopo lavaggi in soluzione fisiologica e in PBS addizionato con antibiotici/antimicotici e metronidazolo, il pezzo tissutale, una volta frammentato, è stato digerito 1h a 37°C con gli enzimi collagenasi (1.5 mg/ml) (GIBCO) e ialuronidasi (20 mg/ml) (Sigma Chemical) (Figura 29).

Al fine di ottenere una coltura primaria, le cellule sono state risospese in DMEM addizionata con 10%FBS, glutamina e antibiotici/antimicotici e piastrate in condizioni di aderenza. Una parte del digesto è stato coltivato in terreno di coltura contenente bFGF (20 ng/ml, Sigma) ed EGF (10 ng/ml, Sigma) e piastrato in una piastra ultra-low attachment (Corning) al fine di ottenere le cellule staminali che crescono in sospensione formando piccole sfere (tiresfere) (Figura 30).





Linea cellulare primaria in DMEM e siero



Tireosfere

Trasduzione cellule staminali e differenziate di tiroide

Per la trasduzione sono state utilizzate circa 1×10^5 cellule staminali tiroidee e cellule differenziate tiroidee, esposte a 1ml di surnatante virale in presenza di polybrene ($8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) per incrementarne l'efficienza di infezione verificata monitorando l'espressione della GFP.

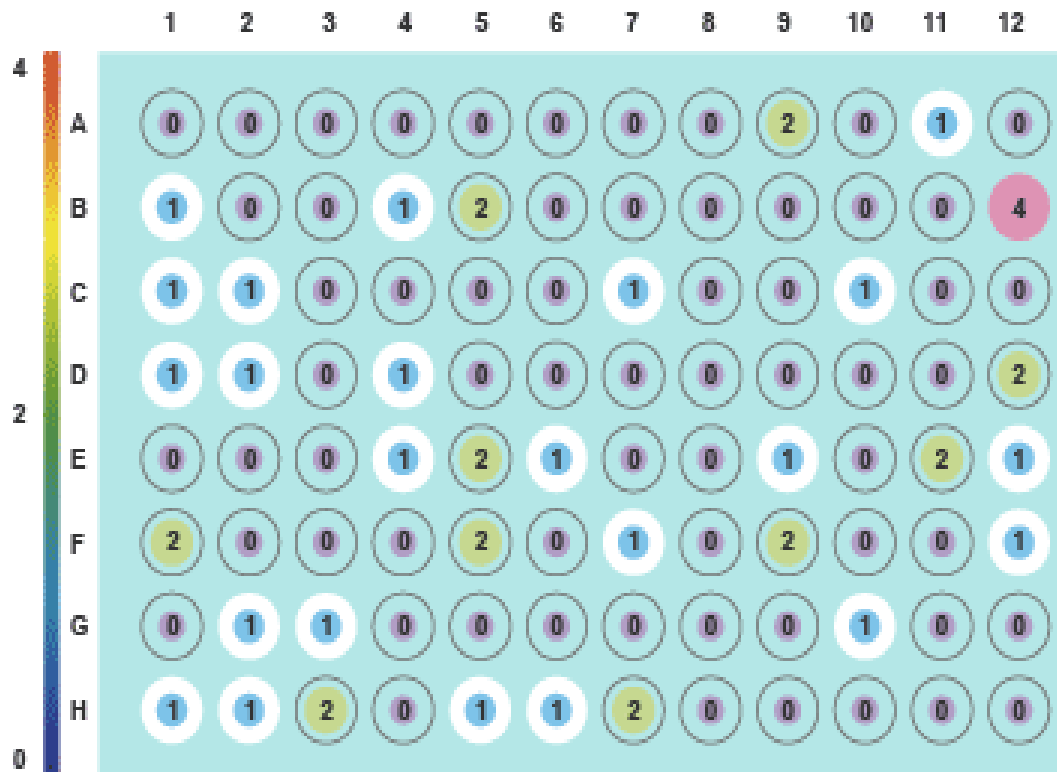
Saggio di clonogenesi di cellule staminali tiroidee trasdotte con $p\text{TweenRET/PTC1}$, $p\text{TweenBRAF}^{V600E}$, $p\text{TweenNras}^{Q61K}$, $p\text{TweenP53}^{R273H}$

Il saggio di clonogenesi rappresenta un saggio di sopravvivenza *in vitro*, basato sull'abilità di singole cellule di crescere formando cloni.

Le cellule dissociate con tripsina sono state piastrate in una piastra ultra low-attachment con 96 pozzetti (Corning). Al fine di ottenere una cellula per pozzetto, la sospensione cellulare viene sottoposta a diluizioni seriali.

I pozzetti che non contengono cellule o più di una cellula sono state escluse dall'analisi. Le cellule vengono monitorate per 3-4 settimane (Figura 31).

La percentuale di cellule clonogeniche è stata calcolata come rapporto tra il numero di pozzetti contenente i cloni e il totale dei pozzetti contenente una singola cellula.

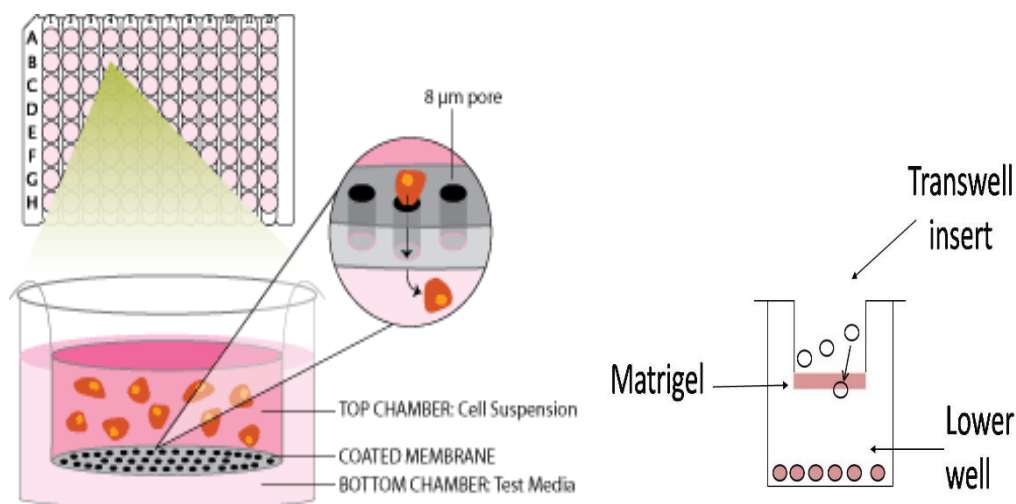


Saggio di invasione di cellule staminali tiroidee trasdotte con $p\text{TweenRET/PTC1}$, $p\text{TweenBRAF}^{V600E}$, $p\text{TweenNras}^{Q61K}$, $p\text{TweenP53}^{R273H}$

La capacità invasiva delle cellule staminali trasdotte è stata misurata attraverso la loro capacità di migrare attraverso Transwell (Corning) coatate con Matrigel (BD biosciences). Il Matrigel è una membrana solubile derivante da estratti di sarcoma indotto in topi EHS, tumore che produce molte proteine della matrice extracellulare come la laminina, collagene IV, proteoglicani solforati e fattori di crescita (Figura 32).

Si eseguono alcuni lavaggi per valutare l'integrità della membrana; in seguito le Transwell (pori di 8µm) si pongono dentro i pozzetti della piastra. Ad ogni Transwell sono stati aggiunti 25µl (2.5 mg/ml) di Matrigel diluito 1:3 con il terreno di coltura contenente bFGF (20 ng/ml, Sigma) ed EGF (10 ng/ml, Sigma). Il Matrigel gelifica dopo 1h a 37°C.

Le cellule (1.5×10^3) dissociate con tripsina sono state risospese in 200 μ l di terreno contenente bFGF (20 ng/ml, Sigma) ed EGF (10 ng/ml, Sigma) e piastrate nelle Transwell. Alla base del pozzetto sono stati aggiunti 600 μ l di terreno di coltura condizionato (surnatante NHI-3T3). A 24h dalla piastratura viene contato il numero di cellule migrate.



Inoculo sottocute di cellule staminali tiroidee trasdotte con $p\text{TweenRET/PTC1}$, $p\text{TweenBRAF}^{V600E}$, $p\text{TweenNras}^{Q61K}$, $p\text{TweenP53}^{R273H}$ in topi NOD/SCID IL2^{-/-}

I topi NOD/SCID IL2^{-/-} sono un ceppo di topi non obesi, diabetici e immunodeficienti, cioè completamente privi di linfociti B e T a causa di un blocco precoce nella maturazione linfocitaria. Rappresentano un ottimo modello di studio delle malattie del sistema immunitario, dei rigetti di trapianti e degli effetti di varie malattie tra cui tumori e neoplasie.

5×10^5 tireosfere normali e trasdotte con i vettori lentivirali codificanti *RET/PTC1*, *BRAF*^{V600E}, *P53*^{R273H} sono state iniettate nel sottocute di topi NOD/SCID in presenza di Matrigel Growth Factor reduced (BD biosciences) diluito in un rapporto 1:2 con il terreno di coltura per un volume finale di 100 μ l.

La crescita del tumore è stata monitorata una volta a settimana per 10 settimane.

BIBLIOGRAFIA

1. Romei C., *et al.* RET/PTC traslocations and clinico-pathological features in human papillary thyroid carcinoma. *Frontiers in Endocrinology* **3**, (2012).
2. Endocrinologia oggi. Tumori della tiroide anatomia patologica. Dott.ssa Parente Paola.
3. Nikiforov YE., *et al.* Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat. rev. Endocrinology* **7**, 569-580 (2011).
4. Adeniran A., *et al.* Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestation, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 216-222 (2006).
5. Kimura E., *et al.* High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **63**, 1454-1457(2003).
6. Soares P., *et al.* BRAF mutation and RET/PTC rearrangements are alternative events in etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* **22**, 4578-4580 (2003).
7. Frattini M., *et al.* Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* **23**, 7436-7440 (2004).
8. Frugazzola L., *et al.* Oncogenic rearrangement of RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinoma from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res.* **55**, 5617-5620 (1995).
9. Zhu Z., *et al.* Molecular profile and clinical pathologic features of the follicular variant of papillary carcinoma. An unusually high prevalence of Ras mutations. *Am. J. Clin. Pathol.* **120**, 71-77 (2003).
10. Namba H., *et al.* Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1474-1479 (1990).
11. Lemoine NR., *et al.* High frequency of ras oncogene activation in all stage of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* **4**, 159-164 (1989).
12. Nikiforova MN., *et al.* Ras and PAX8/PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metb.* **88**, 2318-2326 (2003).
13. Fagin J.A., *et al.* High prevalence of mutation of p53 gene in poorly differentiated thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* **91**, 179-184 (1993).

14. Moore J.H., *et al.* Anaplastic transformation of metastatic follicular carcinoma of the thyroid. *J. Surg. Oncol.* **29**, 216-221 (1985).
15. Nikiforova M., *et al.* Molecular Diagnostics and Predictors in Thyroid Cancer. *Thyroid.* **19**, 1351-1361 (2009).
16. Mingzhao X. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature Reviews Cancer* **13**, 184-199 (2013)
17. Kimura E., *et al.* High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 1454-1457
18. Soares P., *et al.* BRAF mutation and RET/PTC rearrangements are alternative events in etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* **22**, 4578-4580 (2003).
19. Frattini M., *et al.* Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* **23**, 7436-7440 (2004).
20. Nikiforova MN., *et al.* RAS point mutations and PAX8/PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2318-2326 (2003).
21. Kondo T., *et al.* Pathogenetic mechanism in thyroid follicular cell neoplasia. *Nature Rev.* **6**, 292-306 (2006).
22. Grieco M., *et al.* PTC is a novel rearranged form of the proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* **60**; 557-563 (1990)
23. Tong Q., *et al.* Leucine zipper-mediated dimerization is Essential for the PTC1. *Oncogenic Activity J. Biol. Chem.* **272**, 9043–9047 (1997).
24. Jhiang S.M., *et al.* Targeted expression of the RET/PTC1 oncogenes induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology* **137**, 375-378 (1996).
25. Santoro M., *et al.* RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *European Jour. Endocr.* **155**, 645-653 (2006).
26. Santoro M., *et al.* Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene* **12**, 1821-1826 (1996).

27. Powell D., *et al.* the RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroid. *Cancer Res.* **58**, 5523-5528 (1998).
28. Puxeddu E., *et al.* Clinical implication of BRAF mutation in thyroid carcinoma. *Cell Trend in Endocrinology e Metabolism* **9**, 138-145 (2008).
29. C. Wellbrock, *et al.* The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 875–885 (2004).
30. Kam-Tsung-Tang. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implication. *J. Chin Med. Assoc.* **73**, 113-128 (2010).
31. Leicht T. D. Raf kinases: regulation and role in human cancer. *Biochim. Et Bioph. Acta* **1773**, 1196-1212 (2007).
32. Garnett M., *et al.* Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* **6**, 313–319 (2004).
33. Roy S., *et al.* 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol* **18**, 3947–3955 (1998).
34. Wan PT., *et al.* Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**:855–67 (2004).
35. Brummer T., *et al.* Functional analysis of the regulatory requirements of BRAF and BRAFV600E oncoprotein. *Oncogene* **25**, 6262-6276 (2006).
36. Robinson M., *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180–6 (1997).
37. Cohen Y., *et al.* BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* **95**, 625-627 (2003).
38. Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Modern pathology* **24**, 534-543 (2011).
39. Ugolini C. *et al.* Presence of BRAFV600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* **17**, 381-388 (2007).
40. Mitsutake N. *et al.* Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res.* **65**, 2465-2473(2005).
41. Liu D., *et al.* Suppression of BRAF/MEK/MAPK pathway restores expression of iodine-metabolizing genes in thyroid cancer cells expression of BRAV600E mutant. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1341-1349 (2007).

42. Mesa C., *et al.* Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profile that predicts a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res.* **66**, 6521-6526 (2006).
43. Willumsen BM., *et al.* The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310**, 583-586 (1984).
44. Yoshimi T., *et al.* Small GTP-binding preoteins. *The American Physiol. Society* (2001).
45. Rowinsky EK., *et al.* Ras Protein Farnesyltransferase: A Strategic Target for Anticancer Therapeutic Development. *American Society of ClinicalOncology* **17**, 3631-3652 (1999).
46. Forbes SA., *et al.* COSMIC: mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* **39**, 945–50 (2001).
47. Malaguarnera R., *et al.* p53 family protein in thyroid cancer. *Endocrine-Rel. Cancer* **14**, 43-60 (2007).
48. Dong P., *et al.* Elevated expression of p53 gain-of-function mutation R175H in endometrial cancer cells can increase the invasive phenotypes by activation of the EGFR/PI3K/AKT pathway. *Mol Cancer* **8**, (2009).
49. Fagin J.A., *et al.* High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *Journ. Of Clin. Invest.* **91**, 179-184 (1993).
50. Ray D., *et al.* The functionality of p53 in thyroid cancer. *Updates in the understanding and management of thyroid cancer* **2**, 34-52 (2012).
51. Catalano V., *et al.* Human thyroid cancer stem cells. *Stem cells and Cancer stem cells* **2**, 137-143 (2012).
52. Todaro M., *et al.* Colon Cancer Stem Cells: Promise of targeted therapy. *Gastroenterology* **138**, 2151-2162 (2010).
53. C.M. Morshead., *et al.* Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**, 1071–1082 (1994).
54. Fuchs E., *et al.* The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell* **137** 811–819 (2009).
55. Ito M., *et al.* Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **447**, 316–320 (2007).
56. Zeuner Ann., *et al.* Le cellule staminali: spunti per un’azione didattica.

57. Lin, R.Y., Thyroid cancer stem cells. *Nat. Rev. Endocrinology* **7**, 609-616 (2011).
58. Venkatesh YS, *et al.* Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer* **66**, 321-330 (1990).
59. McIver, B., *et al.* Anaplastic thyroid carcinoma: 50-years experience at a single institution. *Surgery* **130**, 1028-1034 (2001).
60. Dumont J.E., *et al.* Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol. Rev.* **72**, 667-697 (1992).
61. Nikiforova MN., *et al.* Low prevalence of BRAF mutations in radiation induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett.* **209**, 1-6 (2004).
62. Takano T., Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: theory and practice. *Semin. Cancer Biol.* **17**, 233-240 (2007).
63. Van Vliet G., Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clinical Genetics* **63**, 445-455 (2003).
64. Davies TF. ,*et al.* Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenoma to Graves disease. *Journal of Clinical Investigation* **115** 1972-1983 (2005).
65. Todaro M., *et al.* Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Research* **70**, 8874-8885 (2010).
66. Nikiforov, *et al.* Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster. Phatomorphologic study of 84 cases (1991-1992) from the Republic of Belarus. *Cancer* **74**, 748-766 (1994).
67. Jhiang S.M., *et al.* Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology* **137**, 375-378 (1996)